TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO

TESIS

Evaluación de moléculas con actividad farmacológica contra amastigotes de Tripanosomátidos y su impacto en la O-GlcNAcilación

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestro en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico

PRESENTA

Eduardo Ramos Juárez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Eduardo Lorenzo Pérez Campos

CO-DIRECTORA

Dra. Adriana Moreno Rodríguez

ASESORES

Dra. Yobana Pérez Cervera
Dr. Margarito Abelardo Martínez Cruz

Oaxaca de Juárez, Oaxaca, Diciembre del 2025.

Educación
Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico de Oaxaca
División de estudios de posgrado e investigación
Maestría en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico

Oaxaca de Juárez, Oax., 11/noviembre/2025

Oficio No. DEPI-633/2025

Asunto: Autorización de impresión de tesis.

HUITZILÍ DÍAZ JAIMES
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES.
P R E S E N T E

Por este medio, comunico a usted que de acuerdo con las disposiciones establecidas en los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública, el estudiante **Eduardo Ramos Juárez** con número de control M23160052, ha cumplido con todas las recomendaciones que el Comité Revisor hizo respecto a su tesis cuyo título es "Evaluación de moléculas con actividad farmacológica contra amastigotes de Tripanosomátidos y su impacto en la O-GlcNAcilación", para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico.

Por lo anterior, la División a mi cargo le concede la autorización para que proceda el trámite correspondiente y la impresión de la misma.

A T E N T A M E N T E
Excelencia en Educación Tecnológica.
Tecnología Propia e Independencia Económica

Educación | TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

IVÁN ANTONIO GARCÍA MONTALVO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.c.p. Archivo.
IAGM/FFA*cmh



2025 Año de La Mujer Indígena

Av. Ing. Víctor Bravo Ahuja No. 125 Esquina Calzada
Tecnológico, C.P. 68030. Tel. 951 50 150 16
e-mail: posgrado.mcdrt@itoaxaca.edu.mx
www.oaxaca.tecnm.mx

ESPACIO 100% LIBRE PLÁSTICO

Educación
Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Oaxaca
División de estudios de posgrado e investigación
Maestría en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico

Oaxaca de Juárez, Oaxaca, **11/noviembre/2025**
Oficio No. DEPI-634/2025

ASUNTO: Autorización de impresión de tesis

EDUARDO RAMOS JUÁREZ
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO
PRESENTE

De acuerdo con las disposiciones para la Operación de Estudios de Posgrado e Investigación del Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo con respecto a su Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, cuyo título es "Evaluación de moléculas con actividad farmacológica contra amastigotes de Tripanosomátidos y su impacto en la O-GlcNAcilación", los abajo firmantes, integrantes de la Comisión Revisora le concedemos la autorización para que proceda a la impresión de la misma.

A T E N T A M E N T E
Excelencia en Educación Tecnológica®
Tecnología Propia e Independencia Económica

DR.. EDUARDO LORENZO PÉREZ CAMPOS
DIRECTOR DE TESIS

DRA. ADRIANA MORENO RODRIGUEZ
CO-DIRECTORA

DR. MARGARITO A. MARTÍNEZ CRUZ
ASESOR

DRA. YOBANA PÉREZ CERVERA
ASESORA

Educación | TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
Vo.Bo.

IVÁN ANTONIO GARCÍA MONTALVO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.c.p. Archivo.
IAGM/FFA*cmh

Educación
Secretaría de Educación Pública
Ciencia y Tecnología
Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación
TECNM MEXICO

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez, el día 07 del mes de Noviembre del año 2025, el que suscribe Eduardo Ramos Juárez estudiante del programa de Maestría en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, con número de control M23160052, manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, que se desarrolló bajo la dirección de Dr. Eduardo Lorenzo Pérez Campos y cede los derechos del trabajo titulado:
Evaluación de moléculas con actividad farmacológica contra amastigotes de Tripanosomátidos y su impacto en la O-GlcNAcilación.

al TecNM/Instituto Tecnológico de Oaxaca para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información del presente trabajo no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autory/o director del trabajo. Este puede ser obtenido solicitándolo a la siguiente dirección o contacto: ramosjuarez9785@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente.

Eduardo Ramos Juárez
Nombre y firma

Dedicatoria

Para mi abuelo.

La vida no me alcanzaría para agradecerle todo lo que hizo por nosotros, de igual manera no tendría palabras justas para expresarle mi agradecimiento, pero he vivido con usted durante toda mi vida.

Yo he comido en su mesa y dormí bajo su techo, y lo único que puedo hacer es vivir la vida con principios y valores, de esta forma podre honrar su memoria y usted estará conmigo, no solo en mi corazón, sino también en mi forma de vivir, de esta forma seguiré escuchando sus consejos que me servirán de guía, aunque ya no este, y su voz me alcanzara desde donde se encuentre.

Para usted que me vio crecer.

Agradecimientos

El trabajo aquí presente no podría haberse realizado sin el apoyo de todos los compañeros del laboratorio 12 de la facultad de química de la UABJO. Por su apoyo durante estos dos años, muchas gracias chicos.

Un agradecimiento especial a la Dra. Adriana por todo su trabajo y por permitirme realizar este proyecto de tesis, especialmente por todo lo que aprendí durante este tiempo y por su paciencia para conmigo.

Igualmente agradezco a la Dra. Yobana por su apoyo y su guía durante los experimentos realizados para este proyecto, y por sus consejos durante el trabajo de redacción.

Y por supuesto, un sincero agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Eduardo Pérez Campos y al Dr. Margarito. Por la paciencia y su guía durante este proyecto de investigación.

Hay muchas personas que contribuyeron a la realización de este trabajo, y aunque en estas líneas no aparezcan sus nombres. Para mis amigos, los que encontré aquí y los que ya tenía "Muchas gracias"

Resumen

Las leishmaniasis son enfermedades parasitarias que constituyen un serio problema de salud mundial de acuerdo con los datos de la OMS y la OPS cada año se registran de 700 mil a 1 millón de nuevos casos de leishmaniasis, son causadas por tripanosomatidos intracelulares del género *Leishmania spp* y produce distintas manifestaciones clínicas dependiendo de la especie causal. Durante la infección los parásitos ingresan en las células del huésped, invadiendo tejidos y células del sistema inmune como los macrófagos, existen estudios que indican que los parásitos modifican las vías de señalización celular para poder desarrollarse.

La O-GlcNAcilación, una modificación postraduccional de las proteínas en el que una molécula de N-Acetilglucosamina se une al oxigeno de un grupo hidroxilo en residuos de serina o treonina, las proteínas O-GlcNAciladas participan en distintos procesos celulares, debido a esto se plantea la posibilidad de que los niveles de proteínas O-GlcNAciladas se vean afectados por la infección con parásitos tripanosomatidos. Debido a la alta mortalidad y morbilidad de estas enfermedades es necesario el desarrollo de nuevos compuestos que puedan ser utilizados para el desarrollo de fármacos que tengan un mayor efecto contra estos parásitos. En este trabajo de tesis se evaluó una serie de oxadiazoles sintetizada por Delgado-Maldonado et al.(2024), estos oxadiazoles fueron diseñados para inhibir la síntesis de cisteínas proteasas, encimas que tienen un papel importante en la biología del parasito y su metabolismo. Se evaluó el efecto citotóxico contra amastigotes de *Leishmania mexicana* y el efecto de la infección con estos parásitos sobre los niveles de O-GlcNAcilación, para esto se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante MTT y se calculó la CI 50 de los Oxadiazoles contra amastigotes de *L. mexicana*, a partir de estas pruebas se seleccionó el Ox7 para evaluar su efecto en los niveles de O-GlcNAcilación en presencia y ausencia de parásitos, para esta parte se realizaron también estímulos con inhibidores e inductores de la O-GlcNAc. Se utilizo la prueba estadística de ANOVA y se encontró que los niveles de O-GlcNAcilación no se ven afectados significativamente durante el proceso de infección, ni por la presencia del Ox7, sin embargo, esto se puede deber a la variación de datos entre los experimentos independientes, por lo que se sugiere que un mayor número de replicas puede servir para reducir la desviación estándar.

Abstract

Leishmaniasis is a parasitic disease that constitutes a serious global health problem. According to WHO and PAHO data, between 700,000 and 1 million new cases of leishmaniasis are registered each year. It is caused by intracellular trypanosomatids of the genus *Leishmania spp*. and produces different clinical manifestations depending on the causative species. During infection, the parasites enter host cells, invading tissues and immune system cells such as macrophages. Studies indicate that the parasites modify cell signaling pathways in order to develop. O-GlcNAcylation, a post-translational modification of proteins in which an N-acetylglucosamine molecule attaches to the oxygen of a hydroxyl group on serine or threonine residues, results in O-GlcNAcylated proteins participating in various cellular processes. Therefore, it is possible that O-GlcNAcylated protein levels are affected by infection with trypanosomatid parasites. Given the high mortality and morbidity associated with these diseases, the development of new compounds that can be used to create drugs with a greater effect against these parasites is essential. In this thesis, a series of oxadiazoles synthesized by Delgado-Maldonado et al. (2024) were evaluated. These oxadiazoles were designed to inhibit the synthesis of cysteine proteases, enzymes that play an important role in the parasite's biology and metabolism. The cytotoxic effect against amastigotes of *Leishmania mexicana* and the effect of infection with these parasites on O-GlcNAcylation levels were assessed. For this purpose, cell viability assays were performed using MTT, and the IC50 of the oxadiazoles against *L. mexicana* amastigotes was calculated. From these tests, Ox7 was selected to evaluate its effect on O-GlcNAcylation levels in the presence and absence of parasites. For this part, stimuli with O-GlcNAc inhibitors and inducers were also performed. The ANOVA statistical test was used and it was found that O-GlcNAcylation levels are not significantly affected during the infection process, nor by the presence of Ox7; however, this may be due to data variation between independent experiments, so it is suggested that a larger number of replicates may serve to reduce the standard deviation.

Índice

Resumen 7
Introducción 13
1. Capítulo I 16
Marco teórico 16
1.1 Taxonomía y especies relevantes 16
1.2 Leishmaniasis 17
1.2.1 El agente etiológico 18
1.2.2 Trasmisión del parasito 18
1.2.3 Ciclo de vida del parasito 19
1.3 La enfermedad de Chagas 19
1.3.1 El agente etiológico 20
1.4 Mecanismos de patogenicidad 22
1.4.1 Moléculas de superficie 22
1.4.2 Factores de virulencia 23
1.5 Tratamientos actuales y sus limitaciones 24
1.5.1 Limitaciones de los tratamientos. 26
1.5.2 Resistencia a fármacos 26
2. O-GlcNAcilación: fundamentos bioquímicos 27
2.1 Definición y mecanismo 27
2.1.1 Ruta biosintética de las hexosaminas 28
2.1.2 Glicosilación 29
2.1.3 Glicoproteínas 29
2.1.4 O-GlcNAcilación 30
2.1.5 OGT y OGA 30
2.1.6 OSMI-1 31
2.1.7 La O-GlcNAcilación y las enfermedades 31
2.2 Rol en procesos celulares 32
2.3 O-GlcNAcilación en parásitos 33
3. relación entre actividad tiranicida y O-GlcNAcilación 34
4. Oxadiazoles 35

Antecedentes 35
Compuestos en evaluación 36
2. Capítulo II Planteamiento del problema 39
2.1 Planteamiento del problema 39
2.2 Pregunta de investigación 39
2.3 Justificación 40
2.4. Hipótesis 40
2.5. Objetivos 41
2.5.1 Objetivo general 41
2.5.2 Objetivos específicos 41
3. Capítulo III 42
3.1 Metodología 42
3.2 Cultivo celular 44
3.3 Pruebas de citotoxicidad 44
3.4 Tratamientos 45
1.4 Extracción de proteínas 46
3.5 Cuantificación de proteínas por BCA 46
3.6 Western blot 47
3.6.1 Preparación de la muestra 47
3.6.2 Electroforesis (SDS-PAGE) 48
3.6.3 Transferencia 48
3.6.4 Inmunodetección 49
4. Capitulo IV Resultados 50
4.1 Cultivo de células macrófagos de ratón J774.2 50
4.2 Primer ensayo de citotoxicidad 51
4.3 Segundo ensayo de citotoxicidad de compuestos oxadiazoles 51
4.4 Segundo ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular 52
4.5 Cálculos de la CI50 52
4.6 Estímulos con los compuestos Ox 7 contra *Leishmania mexicana* 53
Análisis de densitometría 57
5. Conclusiones y recomendaciones 61
Referencias 63
Anexos 69

Glosario 75
Abreviaturas 75
Términos 75

Índice de figuras

Figura 1.1 Mosca de la arena, recuperado de Guía para la atención médica de la leishmaniasis en México. 18
Figura 1.2 Estadios morfológicos de Trypanosoma cruzi recuperado de Peña-Callejas et al. (2022). 21
Figura 1.3 Ruta biosintética de las hexosaminas, elaboración propia. 28
Figura 1.4 Isómeros de los de los oxadiazoles, recuperado de Tejas et al. (2022) 35
Figura 3.1 Metodología, prueba de citotoxicidad. Elaboración propia. 42
Figura 3.2 Metodología para los estímulos y cuantificación de proteínas. Elaboración propia. 43
Figura 4.1 Células macrófagos de ratón J774 creciendo en RPMI, a) sembradas recientemente, b) Células ya adheridas, c) células en 90% de confluencia. 50
Figura 4.2 Células J774 infectadas con Leishmania mexicana. 50
Figura 4.3 Porcentaje de viabilidad celular de Leishmania mexicana. 51
Figura 4.4 Porcentaje de viabilidad celular de Leishmania mexicana segundo ensayo. 52
Figura 4.5 Curva de calibración para la cuantificación de proteínas usando como estándar albumina sérica bovina 54
Figura 4.6 Proteínas O-GlcNAciladas durante los estímulos. 55
Figura 4.7 Proteínas O-GlcNAciladas durante los estímulos, primera replica. 56
Figura 4.8 Proteínas O-GlcNAciladas durante los estímulos, segunda replica. 57
Figura 4.9 Comparación de las medias de proteínas O-GlcNAciladas. 59
Figura 5.5.1 Comparación de las medias entre tratamientos omitiendo el tratamiento con TMG. 62

Índice de tablas

Tabla 1.1 Taxonomía de Tripanosomatidos de importancia médica, Leishmania spp y Trypanosoma cruzi (Llop et al, 2001). 16
Tabla 1.2 Algunas alteraciones causadas por los medicamentos antiparasitarios, recuperado de Werner & Zulantay (2011). 22
Tabla 1.3 Fármacos utilizados contra la leishmaniasis, recuperado de Moncada Diaz et al. 2024 26
Tabla 1.4 Compuestos Oxadiazoles recuperado de Delgado Maldonado et al.(2024)....37
Tabla 3.1 Tratamientos aplicados en las células J774.2 46
Tabla 3.2 Volúmenes para la elaboración de muestras....48
Tabla 4.1 CI_{50} calculadas para los fármacos de referencias vs amastigotes de L. mexicana. ..53
Tabla 4.2 CI_{50} calculadas para los oxadiazoles 53
Tabla 4.3 Volúmenes utilizados en la preparación de muestras para la electroforesis....55
Tabla 4.4 Resultados del análisis Anova para comparar media de múltiples grupos, exportada de GraphPad Prism 8. 58

Introducción

Las leishmaniasis es una enfermedad causada por parásitos protozoarios del género *Leishmania spp*., esta enfermedad tiene distintas variantes las tres principales, son la leishmaniasis cutánea, la visceral y la mucocutánea, se transmite por la picadura de un mosquito flebótomo hembra del género phlebotomus (en el viejo mundo) y Lutzomyia (en el nuevo mundo).

Estas enfermedades constituyen un serio problema de salud ya que está presente en prácticamente todos los continentes, a excepción de la Antártida y Australia. Las leishmaniasis son catalogadas como enfermedades tropicales desatendidas, debido a que anteriormente no se le daba la importancia necesaria ya que era un problema limitado a los países donde la enfermedad es endémica muchos de ellos en vías de desarrollo y sectores marginados de la población, principalmente en las zonas rurales cuya población vive en condiciones precarias, con acceso limitado a los sistemas de salud y donde las condiciones climáticas favorecen la presencia del vector. Por lo que históricamente las personas vulnerables y en riesgo de contagio son los agricultores y campesinos, así como los soldados u otros trabajadores cuya actividad laboral les exige estar en presencia del vector, exponiéndolos a las picaduras y por lo tanto al contagio de la leishmaniasis.

La transmisión de la enfermedad está asociada a distintos factores, además de los sociales, ambientales y climáticos, la migración y al desarrollo urbano con la invasión de los nichos ecológicos. El ciclo de vida natural de los parásitos del género *Leishmania spp*. incluye un amplio reservorio de mamíferos pequeños como roedores, además de que los animales domésticos como perros y gatos también pueden contagiarse. La trasmisión del parasito se produce por la picadura del mosquito, cuando este se alimenta de la sangre de un portador del parasito, los paracitos en forma de amastigote ingresan al mosquito vector, dentro de este se transforman en promastigotes y migran a la proboscis, de esta manera cuando el mosquito se alienta de otro ser vivo, los parásitos consiguen un nuevo anfitrión, entonces los promastigotes ingresan a las células, se multiplican dentro de las mismas y se propagan invadiendo tejidos, la relación de las diferentes especies de *Leishmania* y sus mosquitos vectores es muy estrecha, por lo que en cada región predomina una especie de *Leishmania* que es trasmitida por una especie especifica de mosquito, tal es el caso de México, donde es más común los casos de leishmaniasis

cutánea que es producida por la especie *Leishmania mexicana* y su principal vector es Lutzomyia olmeca. La leishmaniasis es endémica en 99 países y existen 12 millones de personas infectadas (OMS, 2024).

Entre los fármacos utilizados para estas enfermedades se encuentran anfotericina B, antimoniato de meglumina y pentamicina, sin embargo, los medicamentos disponibles no son tan eficaces en una etapa avanzada de la infección y también resultan tóxicos para el organismo. Los paracitos responsables de estas enfermedades presentan distintos estadios durante su ciclo de vida, siendo el tripomastigote y el amastigote unos de los estadios principales. El amastigote es la forma intracelular del parasito, es decir la forma que presentan cuando están dentro de la célula hospedera, es una forma replicativa que se alimenta de la célula para seguir replicándose. Debido a la dependencia del paracito con la célula se plantea una posible conexión entre la proliferación del paracito y las rutas celulares para la obtención de nutrientes como lo es la vía biosintética de las hexosaminas.

La vía biosintética de las hexosaminas (HBP) es un sensor generalizado de estado metabólico, se encarga procesar metabolitos de la descomposición de glucosa, aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos con la regulación de la transducción de señales, la regulación transcripcional y el destino metabólico de la glucosa (Bond & Hanover, 2015).

Esta vía tiene como producto principal la UDP-GlcNac que sirve como sustrato a la O-GlcNAcilación, un tipo de glicosilación se trata de una modificación enzimática postraduccional reversible que se encuentra en los residuos de aminoácidos (serina y treonina) de proteínas nucleares, citoplasmáticas y mitocondriales, que es regulado por dos enzimas catalizadoras OGT (O-GlcNAtrasferasa) y OGA (O-GlcNAcasa) (Juárez et al, 2017).

Al ser un proceso que depende de la HBP, las alteraciones en esta ruta metabólica pueden causar un aumento o disminución en la O-GlcNAcilación. Estudios recientes señalan que la O-GlcNAcilación está relacionada con diversas patologías como cáncer y trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer, y debido a la participación de las proteínas O-GlcNAciladas en la regulación del sistema inmune y en distintas respuestas celulares a estímulos, sin embargo, no existen datos sobre la relación entre los niveles de O-GlcNAcilación de proteínas celulares y la infección por paracitos.

Debido al serio problema de salud que representan estas enfermedades y al limitado número de fármacos utilizados para el tratamiento, muchas investigaciones se realizan con el fin de encontrar y desarrollar nuevos fármacos que sirvan como una mejor opción para el tratamiento. Entre los compuestos más investigados para el desarrollo de nuevos fármacos se encuentran los oxadiazoles, se trata de un grupo de moléculas con un gran potencial farmacológico que puede ser incluido en la composición de fármacos ya que estos compuestos han demostrado tener un potencial efecto contra agentes infecciosos como virus, bacterias y protozoarios.

Delgado-Maldonado et al.(2024), trabajaron en el diseño, síntesis y evaluación de una nueva serie de oxadiazoles que demostraron tener efecto anti *Leishmania mexicana* y anti *Trypanosoma cruzi*. Para este trabajo de tesis se estudiaron esta serie de compuestos oxadiazoles contra amastigotes de *Leishmania mexicana* y para cuantificar los niveles de proteínas O-GlcNAciladas durante la infección en células J774.2.

1. Capítulo I

Marco teórico

1.1 Taxonomía y especies relevantes

La familia de Trypanosomatidae del orden Kinetoplástida perteneciente al reino eucariota, comprende un grupo de organismos caracterizados por presentar un organelo llamado cinetoplasto, dentro de este grupo de organismos se encuentran patógenos estrictamente parasitarios, incluyendo especies que parasitan humanos, como *Leishmania spp.* y *Trypanosoma cruzi.* La clasificación taxonómica de estos dos géneros de microorganismos se basa en distintos criterios ecobiologicos, en el caso de *Leishmania* se basa en la distribución geográfica, el tipo de tropismo y manifestaciones clínicas, el género *Leishmania* se divide en dos subgéneros, *(L) Leishmania* y *(L) Viannia*. Mientras que el género *Trypanosoma* se basa en la morfología y desarrollo del vector (Fraga Nodarse et al., 2021).

Clasificación taxonómica	
Leishmania spp	*Trypanosoma cruzi*
Reino: Protista	Reino: Protista
Subreino: Protozoa	Subreino: Protozoa
Phyllum: Sarcomastigophora	Phyllum: Sarcomastigophora
Subphyllum: Mastigophora	
Clase: Zoomastigophorea	Clase: Zoomastigophora
Orden: Kinetoplastida	Orden: Kinetoplastida
Suborden: Trypanosomatina	
Familia: Trypanosomatidae	Familia: Trypanosomatidae
Género: Leishmania	Género: Trypanosoma
	Subgénero: schizotrypanum
	Especie: cruzi

Tabla 1.1 Taxonomía de Tripanosomatidos de importancia médica, *Leishmania spp* y *Trypanosoma cruzi* (Llop et al, 2001).

Entre las especies relevante de *Leishmania* en el nuevo mundo se encuentran la *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania brazilienzis* y *Laishmania panamensis*. Los distintos tipos de tropismo que se pueden presentar por la infección de estos paracitos está determinado por la especie que infecta al huésped. Por ejemplo, *Leishmania mexicana* produce lesismaniasis cutánea, mientras que *Leishmania braziliencis* es la responsable de causar leishmaniasis visceral.

Las especies mencionadas anteriormente son de importancia medica debido a la incidencia y mortalidad que tienen las enfermedades causadas ore sotos paracitos tripanosomatidos, como veremos a continuación las leishmaniasis producidas por parásitos de *Leishmania spp*. y la tripanosomiasis también conocida como la enfermedad de Chagas que es producida por *Trypanosoma cruzi*, son enfermedades que constituyen un grave problema de salud a nivel mundial.

1.2 Leishmaniasis

De acuerdo con la OPS (Organización Panamericana de la Salud), las leishmaniasis son enfermedades zoonóticas y de transmisión vectorial con complejo ciclo de transmisión donde se involucra una gran diversidad de parásitos, reservorios y vectores. Se conocen más de 20 especies del género *Leishmania* que producen esta enfermedad, y más de 90 especies de flebótomos dentro de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* transmiten los parásitos a los animales y humanos a través de la picadura, además de que aproximadamente 70 especies son el reservorio natural para estos parásitos, incluyendo el ser humano (Leishmaniasis, 2024).

La leishmaniasis tiene tres formas de manifestación, leishmaniasis visceral, que es mortal en el 95% de los casos, produce episodios de fiebre irregular, agrandamiento de hígado y baso, anemia y pérdida de peso, la mayoría de los casos se da en Brasil, el este de África y la India; leishmaniasis cutánea, es la forma más frecuente, provoca lesiones cutáneas ulcerosas; leishmaniasis mucocutánea, provoca la destrucción de las membranas mucosas de la nariz, boca y garganta, más del 90% de los casos se da en Bolivia, Brasil, Etiopia y Perú (OMS, 2023).

Existe evidencia de casos de leishmaniasis en México desde la época precolombiana, mientras que los primeros registros de casos de leishmaniasis se dieron a principio del siglo XX, en 1912 se registraron casos de leishmaniasis en los trabajadores que recolectaban clique de los árboles

Minilkara zapota, por lo que la enfermedad fue llamada ulcera de los chicleros. El agente causal de los casos de leishmaniasis en México es *Leishmania mexicana*, mientras que el principal vector es *Lutzomyia olmeca* (Vargas Martínez, 2011).

1.2.1 El agente etiológico

El agente etiológico de la leishmaniasis es un protozoario di mórfico del género *Leishmania*, pertenece al reino Protista, subreino Protozoa, del orden kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae. Del género *Leishmania* existen alrededor de 22 especies patógenas para el ser humano, que se agrupan en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, en la región de las Américas se han encontrado 15 especies que se asocian a distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad (Secretaria de Salud, 2022).

1.2.2 Trasmisión del parasito

En su ciclo de vida natural, cada especie de *Leishmania spp*. está adaptada de acuerdo con los mamíferos y moscas de arena presentes en su entorno. Las moscas están más activas durante el amanecer, el atardecer y la noche, suelen habitar en lugares húmedos y frescos, son atraídas por la luz y pueden ingresar a edificios por la noche, además de las moscas, otros artrópodos como garrapatas y pulgas pueden servir como vectores mecánicos. En mamíferos, los síntomas pueden no presentarse por largos periodos de tiempo, y después de curarse clínicamente a un pueden tener al parasito y trasmitirlo a las moscas de arena. Por otro lado, los animales domésticos y los seres humanos son huéspedes accidentales para las especies de *Leishmania spp* que se mantiene entre mamíferos silvestres y moscas de la arena (Vargas Martínez, 2011).



Figura 1.1 Mosca de la arena, recuperado de Guía para la atención médica de la leishmaniasis en México.

Durante su ciclo de vida estos parásitos se pueden encontrar en dos estadios distintos, el epimastígote; que es la forma infectante, móvil y flagelada, mide entre 20 y 30 μm y normalmente se encuentra en los mosquitos vector, el amastigote; se trata de la forma replicativa la cual mide entre 2 y 5 μm, es intracelular, móvil y redondeada, carece de flagelo y se multiplica en el interior de las células macrófagos y otras células del sistema reticuloendotelial del huésped (Secretaria de Salud, 2022).

La capacidad infectiva de los parásitos del género Leishmania, puede variar dependiendo de las condiciones en las que se encuentre y de la especie, por lo que es necesario que se realice un seguimiento en cada caso particular. Los estudios in vitro sobre la capacidad infectiva pueden ser utilizados en nuevos estudios para el desarrollo de fármacos más eficaces (Calvan Sánchez, 2015).

Los factores que influyen en la epidemiologia de la leishmaniasis se pueden ver afectados por distintos mecanismos, la evidencia sugiere que el cambio climático puede afectar al proceso de transmisión del parasito, influyendo en aspectos como la distribución del parasito, abundancia, dispersión, nicho ecológico, hospederos y distribución geográfica. El crecimiento demográfico y la invasión del nicho ecológico del vector, así como su distribución son aspectos a tomar en cuenta para la prevención a futuro de los casos de leishmaniasis (Pacheco et al., 2023).

1.2.3 Ciclo de vida del parasito

El reservorio para estos parásitos incluye distinto mamíferos, incluyendo animales domésticos, el ciclo de vida comienza cuando una mosca de la arena pica a un mamífero contagiado, transportando células infectadas, el ciclo de vida dentro de la mosca es de unos 10 días aproximadamente y cuando la mosca pica a otro mamífero, los promastigotes que transporta son absorbidos por los macrófagos del nuevo huésped, dentro de estas células, los promastigotes se convierten en amastigotes y se comienzan a replicar, cuando son liberados de la célula se transforman de nuevo en promastigotes (Youash Lazar, 2020).

1.3 La enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una afección parasitaria causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, que circula entre insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae* y unas 150 especies mamíferas. La enfermedad de Chagas fue llamada así por el doctor Carlos Ribeiro

Justiniano Chagas, quien describió las manifestaciones clínicas por primera vez en 1909 (Peña-Callejas et al., 2022).

En el 2005 la OMS reconoció a la enfermedad de Chagas como una enfermedad tropical desatendida, esto ayudo a fortalecer las medidas de prevención, diagnóstico y tratamiento temprano y también a combatir la desinformación al respecto. En la hoja de ruta de las enfermedades desatendidas se incluyó al Chagas como una de las enfermedades que se pretenden eliminar, para ello se plantearon cinco metas, sin embargo, todas ellas están dirigidas a la prevención y a interrumpir la transmisión del paracito, dejando de lado el desarrollo de nuevos fármacos para combatir la infección y aumentar el éxito de los tratamientos (OMS, 2024).

La enfermedad es endémica de 21 países del continente Americano y se estima que hay entre 6 y 8 millones de personas infectadas, cerca de 65 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad y produce unas 12 mil muertes por año. Esta enfermedad afecta principalmente a las comunidades campesinas, debido a los triatominos domiciliados, que son los principales responsables de la transmisión al ser humano (OPS, 2023).

La enfermedad de Chagas suele tener dos etapas, la fase crónica y la fase aguda, la manera en la que se detecta es por medio de estudios epidemiológicos y tamizajes para la donación de sangre, en la fase crónica se puede detectar por pruebas serológicas y estudios de gabinete (Peña-callejas et al., 2022).

1.3.1 El agente etiológico

El agente causal es el *Trypanosoma cruzi*, un parásito flagelado perteneciente a la familia de los tripanosomatidos, El *Trypanosoma cruzi*, presenta tres estadios morfológicos en el ciclo de su vida (fig. 1), las cuales son; amastigote, epimastígote y tripomastigote, el amastigote es la replicativa intracelular que se produce en el huésped mamífero, el epimastígote es la forma replicativa no infectiva para el humano o mamífero y se encuentra en el vector invertebrado y la el tripomastigote meta cíclico es una forma no replicativa pero si es infectiva (Murillo-Godínez et al., 2018).

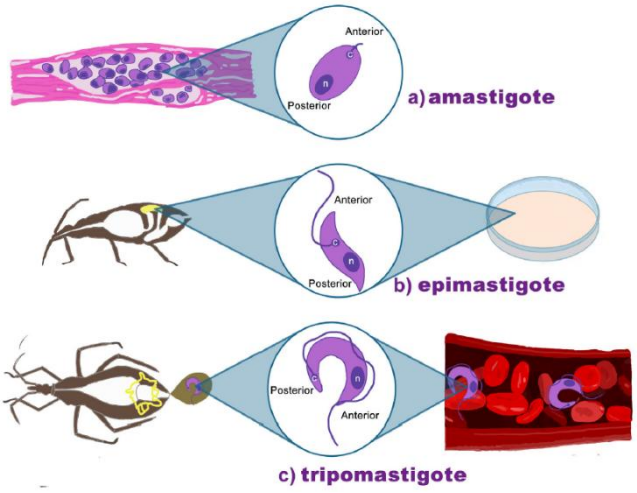


Figura 1.2 Estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi* recuperado de Peña-Callejas et al. (2022).

Para el tratamiento de Chagas actualmente se cuentan aprobados solo dos fármacos, Benznidazol y Nifurtimox, sin embargo, estos son más efectivos durante el inicio de la fase aguda de la enfermedad. Además de producir distintos efectos adversos (Tabla 1) (Werner & Zulantay, 2011).

Para el tratamiento de la enfermedad se debe tomar en cuenta la condición médica particular de cada caso, debido a que la prescripción de Nifurtimox y Benznidazol esta contraindicada para pacientes con trastornos neurológicos grabes, hemopatías, hepatopatías, nefropatías y en mujeres con periodo de lactancia. Además, hasta el 65% de los casos de cardiopatía producida por el Chagas terminan en muerte súbita, por lo que los tratamientos deben estar enfocados también en la reducción del daño al corazón (Murillo-Godínez et al., 2018).

Tipos de alteraciones	
Generales y digestivas	Baja de peso, malestar gástrico, náuseas y vómitos
Hematológicas por hipersensibilidad	Leucopenia, trombocitopenia y agranulocitosis
Dermatológicas	Eritema, rash sensible a la luz, dermatitis atópica y ocasionalmente Síndrome de Stevens Johnson

neurológicas	Polineuropatías dosis dependiente

Tabla 1.2 Algunas alteraciones causadas por los medicamentos antiparasitarios, recuperado de Werner & Zulantay (2011).

En México se reportaron los primeros casos en 1940 en dos pacientes del estado de Oaxaca, mientras que el Nifurtimox fue prescrito por primera vez en 1972 (Murillo-Godínez et al., 2018). México es uno de los países que esta alineado a las estrategias del programa para la prevención del Chagas basado en las resoluciones de la OMS y la OPS. El programa para la prevención de la propagación de la enfermedad, entro en vigor en el año 2012 (Secretaria de Salud, 2019).

1.4 Mecanismos de patogenicidad

Los organismos patógenos poseen distintas estrategias para sobrevivir a las condiciones tanto ambientales como en el hospedero, los factores de patogenicidad son componentes que influyen en la capacidad de estos microorganismos para sobrevivir. Entre estos se pueden incluir la virulencia, la inoculación, la adherencia, la invasividad y la inmunosupresión (Inmunosupresion. Diccionario Médico, n.d.).

Los parásitos protozoarios como los tripanosomatidos pasan todo su ciclo de vida dentro de un hospedero y poseen mecanismos que les permiten adaptarse para sobrevivir, evadiendo la respuesta del sistema inmune. Algunos de estos organismos poseen distintos estadios durante su ciclo de vida, que les permiten adaptarse a las condiciones de su entorno y les proporciona resistencia ante los mecanismos de defensas de su anfitrión, por ejemplo los epimastígotes de Tripanosoma africano son susceptibles a los efectos de la vía alterna del complemento (lisis de complemento), sin embargo en el estadio meta cíclico infectivo, los parásitos poseen una cubierta gruesa que sirve de barrera física y al mismo tiempo ocurre una variación antigénica (los niveles de glicoproteínas en la membrana se modifican) (Rosales Borjas, 2008).

En el caso de las enfermedades como la leishmaniasis y la tripanosomiasis, los parásitos tienen estrategias para evadir el sistema inmune como se verá a continuación.

1.4.1 Moléculas de superficie

Las moléculas de superficie conocidas como determinantes invasivos forman parte de los factores de virulencia, en la superficie celular de los promastigotes de *Leishmania* se encuentran

principalmente GP63, proteínas de choque térmico (HSP60, HSP100), fosfatasas y peptidasas de cisteína. La expresión de las proteínas puede variar dependiendo de la cepa de *Leishmania* y del tipo de tropismo que ocasiona, por ejemplo en el caso de leishmaniasis cutánea localizada se produce una respuesta inmune de tipo Th1, lo que favorece una eliminación del parasito, induciendo la producción de proteínas proinflamatorias, además hay evidencia de que la expresión de las proteínas de choque térmico y GP63 juegan un papel importante en la respuesta inmune de tipo Th1, mientras que en la leishmaniasis cutánea difusa, se desencadena una respuesta inmune celular de tipo Th2 lo que produce proteínas antiinflamatorias, favoreciendo así la supervivencia del parasito. (Fernández Figueroa, 2022)

1.4.2 Factores de virulencia

Dentro de los principales factores de virulencia de las especies de *Leishmania spp*, se encuentran los lipofosfoglicanos; se trata de una estructura lipídica recubierta por unidades repetidas de fosfato de disacárido unidas al núcleo de glicanos que se inserta en la membrana a través de un ancla de inositol. Los glicoinositolfosfolipidos; constituyen el principal componente de la superficie celular de los parásitos en el estadio de amastigote, por lo que puede jugar un papel importante en el desarrollo y supervivencia de los amastigotes intracelulares. Proteofosfoglicanos; son fosfoglicanos unidos a proteínas y son producidos por varias especies de *Leishmania* además de que se pueden presentar en distintas formas desde filamentos, secreciones, hasta componentes unidos a membrana, por lo que juegan un papel importante en el establecimiento de la infección por *Leishmania spp*. Cisteína Proteasas de Leishmania; la cual es una molécula importante para el desarrollo y la virulencia del parasito. Uno de los factores de virulencia empleados por *Leishmania spp* durante las etapas tempranas de la infección es la metaloproteasa dependiente de zinc, con un peso aproximado de 63 kD, también llamada leishmanolisina o glicoproteína 63 (GP63), fue descubierta en la década de 1980s y ubicada en la superficie de parásitos tripomastigote pero presenta una disminución en amastigotes. GP63 escinde C3b resultando en iC3b, lo inhibe la cascada de señalización del complemento, evitando así la lisis mediada por complemento, además las moléculas resultantes (iC3b) favorecen la unión y la absorción de los parásitos por los macrófagos del hospedero. (Olivier et al, 2012)

La cisteína proteinasa esta expresada tanto en la forma de promastigotes como en la forma de amastigote de *Leishmania spp*. estas proteínas participan en las actividades vitales para el

desarrollo del parasito, así como en su capacidad para infectar y la neutralización del sistema inmune del huésped. En estudios con cepas de *Leishmania mexicana* donde se inhibió la expresión de cisteína proteinasa se disminuyó en un 80% la infectividad de macrófagos, de igual manera disminuyo el tamaño de las lesiones en ensayos en ratones. Estas proteínas también están presentes en Tripanosoma cruzi por lo que son considerados como una diana farmacológica para el desarrollo de tratamientos. (Hanan, 2022)

1.5 Tratamientos actuales y sus limitaciones

En la actualidad se cuentan con pocos medicamentos que son empleados para el tratamientos de las distintas variantes de la leishmaniasis, la efectividad de los tratamientos depende de distintos factoras como la condición de salud del paciente y la etapa de la enfermedad en la que se encuentre el paciente.

Para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea actualmente solo se cuentan con dos fármacos que generan resultados clínicos y microbiológicos, estos medicamentos están basados en antimoniales pentavalentes, el estibo gluconato de sodio (Pentostan) o antimoniato de meglumina (Glucantime), Pentostan se prescribe en dosis de 20mg/kg/día durante un periodo de 30 días mientras que Glucantime se prescribe en dosis de 10 a 60 mg/kg durante un periodo de 30 días, la aplicación de estos medicamentos puede estar condicionada a la aparición de los efectos secundarios, por lo que no necesariamente se aplican en días consecutivos. Las inyecciones suelen ser intramuscular, las mismas son muy dolorosas lo que puede provocar el abandono del tratamiento por parte del paciente y en ocasiones se administra por vía parental como en el caso de leishmaniasis mucocutánea, se prescriben antimoniales pentavalentes por esta vía durante 28 días, o en otros casos se implementa anfotericina B. Entre los efectos adversos se encuentran principalmente anorexia, náusea, vómito, alteraciones electrocardiográficas, aumento de enzimas hepáticas, de urea creatinina y mialgias. Para la leishmaniasis cutánea difusa, se puede administrar pentamidina, la dosis es de 4mg/kg teniendo un máximo de 240mg/día, se aplica en días alternados, la dosis administrada dependerá de la respuesta clínica y los efectos adversos que presente el paciente, los mismos que pueden incluir, hipertensión, hipoglucemia, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, vértigo, cefalea y epigastralgia. Por otro lado, para la forma visceral de la enfermedad, se prescribe miltefosina oral, se prescribe anfotericina B y anfotericina liposomica. La anfotericina B es una alternativa eficiente, a pesar

de su toxicidad se prescribe para casos de pacientes intolerantes a los antimoniales o cuando los parásitos tienen resistencia a estos mismos, las dosis son de 1mg/kg/día, con una dosis máxima de 50mg/dosis, por otro lado, la anfotericina liposomal se puede administrar en dosis de 2 a 3mg/kg/dosis, durante un periodo de 20 días.(Torrez Guerrero 2018)

En la tabla 2 se puede ver una recopilación de los fármacos utilizados contra la leishmaniasis y el mecanismo por el cual funcionan.

Medicamentos actuales para el tratamiento de la leishmaniasis	**Modo de acción**
Antimoniato pentavalente	Inhibe la encima mitocondria tripanotiona reductasa, aumentando la susceptibilidad del parasito al estrés oxidativo, generado por el macrófago durante la infección. Puede obstruir vías como la oxidación de ácidos grasos y glucolisis.
Miltefosina	Inhibe la encima citocromo c oxidasa, y la síntesis de fosfotidilcolina, afectando el metabolismo de los lípidos a través de la via CDP-colina al actuar sobre la actividad CTP-fosfocolina citidiltransferasa.
Anfotericina B liposomal	Forma canales transmembrana a través de la pared celular, causando microporos en la membrana, aumentando la permeabilidad y la perdida de iones, provocando la muerte celular.
Paromomicina	Inhibe el ribosoma citosólico, afectando la síntesis de proteínas a través de la unión a la ribosómica 16s y creando una alteración en su estructura.

Pentamidina	Inhibe la síntesis de ADN y proteínas y provoca la degradación del ciclo celular en la fase G2/M. Inhibe la ARN polimerasa, lo que conduce a la apoptosis. Inhibe el transporte de arginina.

Tabla 1.3 Fármacos utilizados contra la leishmaniasis, recuperado de Moncada Diaz et al. 2024

Mientras que, para el caso de la enfermedad de Chagas, la OMS recomienda el uso de Nifurtimox y Benzinidasol. El tratamiento con estos fármacos puede eliminar eficientemente al paracito si el tratamiento comienza durante las primeras fases de la infección, sin embargo, la eficiencia del tratamiento disminuye dependiendo del tiempo que lleve de infección el paciente. Los dos fármacos están contraindicados para mujeres embarazadas y personas con insuficiencia renal o apática, además el Nifurtimox tampoco debe ser administrado en personas con antecedentes neurológicos o psiquiátricos. (World Health Organización: WHO, 2025)

1.5.1 Limitaciones de los tratamientos.

Los tratamientos actuales para la leishmaniasis tienen diversas limitaciones que afectan su eficiencia y éxito terapéutico. El resultado del tratamiento depender de muchos factores el estado de salud del paciente, la edad, y el progreso de la enfermedad así como la etapa en que se encuentre la enfermedad, estos factores pueden ser determinantes durante el éxito del tratamiento, sin embargo también los efectos secundarios y lo doloroso que puede resultar la implementación de los medicamentos, contribuye al abandono del mismo por parte del paciente, lo que además de llevar al progreso de la enfermedad también puede producir un incremento en la resistencia del parásitos ante los fármacos utilizados.

1.5.2 Resistencia a fármacos

La resistencia a fármacos se refiere a la disminución de la susceptibilidad de los paracitos hacia los fármacos en una población que era más susceptible. Los paracitos por lo tanto pueden tolerar la concentración de los fármacos aplicados, por lo que las concentraciones necesarias para la eficacia de los tratamientos aumenta. La tolerancia a los medicamentos puede desarrollarse de

forma natural o por un mal manejo del medicamento, aplicando concentraciones menores a las indicadas. (Ponte-Sucre, 2020)

Los primeros reportes de resistencia a los fármacos contra la leishmaniasis como los antimoniales pentavalentes datan desde la década de los 80, cuando se reportó que un 30% de los pacientes tratados con dosis de 10mg/kg, con dosis máximas de 600mg por periodos cortos de 6 a 10 días, no respondió favorablemente al tratamiento, para 1984 ya se implementaban dosis de 20mg durante un periodo de 20 días, en ese mismo año la OMS recomendaba aplicar antimoniatos pentavalentes en dosis de 20mg, con dosis máximas de 850mg, durante 20 días, con estas se obtuvo un porcentaje de éxito del 86% en los tratamientos y además el tratamiento se volvió más extenso con una segunda aplicación durante 20 días para casos de tratamientos fallidos. Posteriormente la OMS recomendaría aumentar el tiempo de tratamiento hasta por 40 días. En estudios realizados en regiones de la India (Nepal y Bahir)durante 30 días en la década de los 90's, se reportó una tasa de éxito del 64% en casos tratados, sin embargo, se reportó una falta de respuesta inicial al tratamiento de un 52% y una recaída del 8%. (Chakravarty, 2010)

En estudios realizados en 2020, Ponte Sucre, evaluó la quimio resistencia de distintas cepas de *Leishmania, L. brasiliensis, L. mexicana, L. amazonensis y L. major*, determinaron la GI50 (concentración que causa la inhibición del 50% del crecimiento celular). Además, en ese mismo estudio se realizaron distintos ensayos para evaluar la relación de la resistencia a los antibióticos y su relación con otros aspectos de parásitos en las cepas de referencia de *L. mexicana y L. braziliensis*, como son: las glicoproteínas-P, los transportadores ABC; factores de virulencia, fosfatasa ácida y proteína meta-1; el metabolismo intracelular y la fosforilación oxidativa. (Ponte Sucre, 2020)

Mientras que para el tratamiento del Chagas también se tiene limitaciones importantes, además de las contraindicaciones de los fármacos y de su toxicidad, las reacciones adversas provocan el abandono del tratamiento.

2. O-GlcNAcilación: fundamentos bioquímicos

2.1 Definición y mecanismo

La O-GlcNAcilación es una de las modificaciones postraduccionales de las proteínas celulares y que tienen lugar en el retículo endoplasmático, el citosol y el núcleo de las células, esta

modificación es necesaria para activar distintas proteínas que participan en diversas funciones celulares, por lo que una alteración en este proceso puede conllevar al desarrollo de diversas patologías, a continuación veremos más a detalle de que se trata la O-GlcNAcilación y su participación en procesos celulares.

2.1.1 Ruta biosintética de las hexosaminas

La ruta biosintética de las hexosaminas (HBP) se considera el sensor más generalizado del estado metabólico e integra metabolitos de la descomposición de glucosa, aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos con la regulación de la transducción de señales, la regulación transcripcional y el destino metabólico de la glucosa.

Los precursores metabólicos de glucosa y junto a la glutamina, acetilcoenzima A (Ac-CoA) y la uridina-5′-trifosfato (UTP) son necesarios para producir de UDP-GlcNAc y el aumento o agotamiento de los niveles de glucosa, glutamina y ácidos grasos libres pueden conducir el flujo a través del HBP, relacionándolo así el estado nutricional de la célula a la producción de UDP-GlcNAc y a la modificación de la proteína O-GlcNAc (Fernández Rojas et al., 2019).

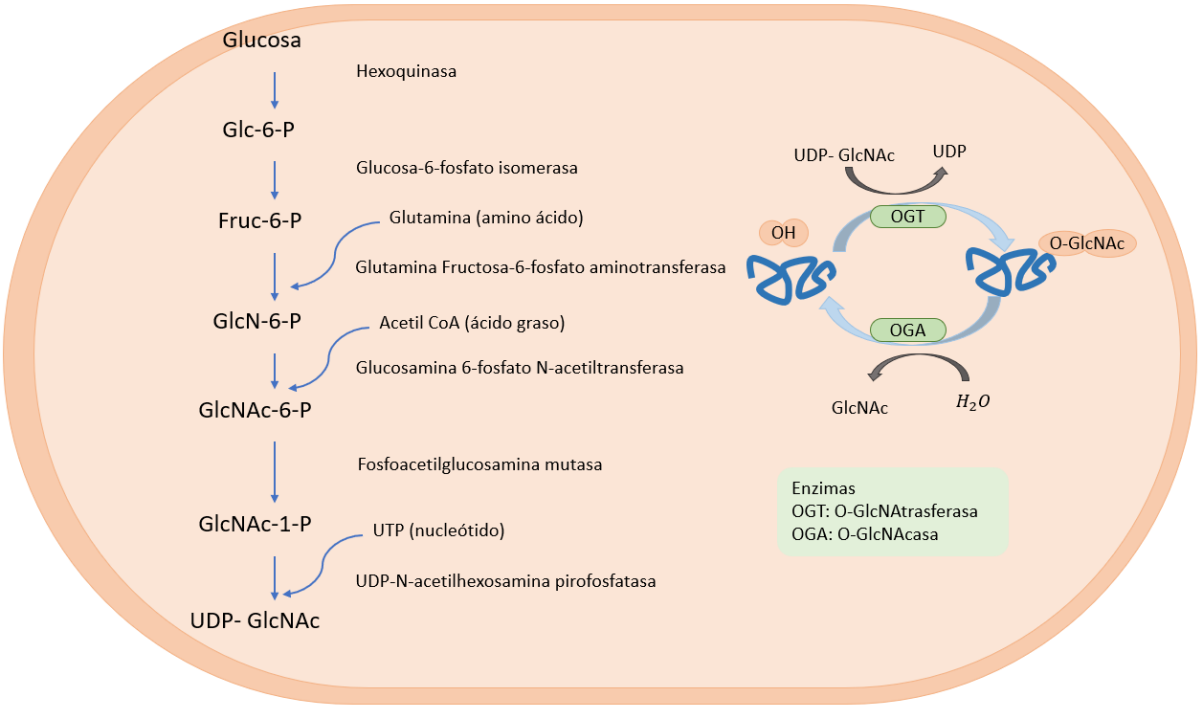


Figura 1.3 Ruta biosintética de las hexosaminas, elaboración propia.

La UDP-GlcNAc se puede utilizar como sustrato para GlcNAc-1-fosfotransferasa al co-traduccionalmente modificar proteínas en el retículo endoplasmático por N-glicosilación. Así mismo, se utiliza como sustrato para modificar covalentemente los residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) de proteínas nucleares y citoplasmáticas únicamente a través de OGT, mientras que O-GlcNAcasa (OGA) es la enzima responsable de la eliminación de esta modificación reversible del azúcar. O-GlcNAc modifica una amplia variedad de proteínas, incluidas las enzimas metabólicas, factores de transcripción y moléculas de señalización (Kim et al.,2022).

2.1.2 Glicosilación

En el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi ocurren modificaciones a la cadena polipeptídica que da paso a la forma tridimensional de las proteínas, necesaria para su funcionamiento biológico. Muchas de las proteínas de las células eucariontes son modificadas postraduccionalmente, una de estas modificaciones es la unión de glicanos a la cadena polipeptídica, estos se unen a la proteína de manera covalente por enlaces N-glicosídico o enlace O-glicosídico.

Los glicanos son divididos en dos grupos los N y O-glicanos, en los N-glicanos las cadenas de oligosacáridos se unen al átomo de nitrógeno de residuos de asparagina en la secuencia de consenso Asn-X-Ser/Thr (X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina), mientras que en los O-glicanos la cadena se une a un átomo de oxígeno de serina/treonina (Ramírez, 2022).

En el aparato de Golgi se lleva a cabo la biosíntesis de los O-glicanos, con la adición de carbohidrato a los residuos de serina o treonina, los O-glicanos pueden tener diversos tamaños desde un solo núcleo, hasta estructuras ramificadas complejas. Los O-glicanos pueden tener distintos tipos de núcleos dependiendo del tipo de azúcar con el que se unan, los tipos de núcleos de O-glicanos en mamíferos son; Gal, Galactosa; GalNAc, N-Acetilgalactosamina; GlcNAc, N-Acetilglucosamina (Ramírez, 2021).

2.1.3 Glicoproteínas

Se trata de glicoconjugados resultantes del enlace covalente de una o varias cadenas de glicanos a un polipéptido. Puede ser un enlace de tipo N o de tipo O. El glicano N-enlazado se refiere a una cadena de carbohidrato unida covalentemente a un residuo de asparagina que forma parte del tripéptido Asn-X-Ser/Thr, en la cadena polipeptídica.

En los glicoconjugados los oligosacáridos se unen a la proteína mediante enlaces N/O-glicosídico y pueden ocurrir tres, en la primera la N-acetilglucosamina (GlcNAc) y se une al grupo amino del residuo de asparagina en la proteína, en el segundo la N-acetilgalactosamina (GalNAc) se une al residuo (también de asparagina) y en el tercero manosa o galactosa se une al grupo hidroxilo de serina o treonina (Oggero et al., 2021).

2.1.4 O-GlcNAcilación

La O-GlcNAcilación es una modificación enzimática postraduccional reversible que se encuentra en los residuos de aminoácidos serina y treonina de proteínas nucleares, citoplasmáticas y mitocondriales. La modificación se caracteriza por un enlace β-glucosídico entre el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de serina o treonina y la N -acetilglucosamina. La O-GlcNAcilación es considerada una modificación altamente dinámica ya que a diferencias de la glicosilación relativamente estables como N- y O-glicanos en las glicoproteínas, los ciclos de la O-GlcNAcilación ocurren rápidamente en la mayoría de las proteínas debido a la acción combinada de las enzimas OGT y OGA que tienen la función de activar y desactivar a la mayoría de las proteínas (Kim et al., 2022).

La O-GlcNAcilación en las proteínas está regulado por enzimas codificadas por solo dos genes: la O-GlcNActranserasa y la β-hexosaminidasa neutra conocida como O-GlcNAcase cuyo sustrato es la UDP-GlcNAc. De manera análoga, la fosforilación y la O-GlcNAcilación son dos PTMs que juegan un papel importante en la señalización celular ya que la mayoría de las de las proteínas humanas son glicosiladas, esta interacción entre modificaciones pueden ocurrir de varias maneras, ya que no solo compiten para el control de los procesos celulares debido a que se dirigen a aminoácidos idénticos (Serina y Threonina) en proteínas al mismo tiempo experimentando una diafonía sino también por los sitios adyacentes de la misma proteína de manera recíproca, y también pueden actuar sinérgicamente, convirtiéndose en una interacción muy compleja influyendo mutuamente de forma positiva o negativa (Zeidan & Hart, 2010).

2.1.5 OGT y OGA

La O-GlcNAtrasferasa (OGT) es la primera enzima que participa en ciclo dinámico de la O-GlcNAcilación y está regulada por varios mecanismos. Cataliza la adición de N -

acetilglucosamina de UDP-GlcNAc a residuos específicos de Serotonina/Treonina para formar una β-O- enlace glicosídico.

La β-N-acetilglucosaminidasa nucleocitoplasmática también conocida como O-GlcNAcasa (OGA), es una hexosaminidasa monomérica, que de manera óptima incide β – ligada a restos de GlcNAc cerca de un pH neutro. Es la segunda enzima que participa en la modificación de la O-GlcNAcilación, actúa como borrador de la O-GlcNAcilación agregada por la OGT en la cual su acción es hidrolizar el resto de azúcar de los aceptores de proteínas, es decir, cataliza la eliminación de O-GlcNAcilación (Juárez J. H. et al., 2017).

2.1.6 OSMI-1

La O -GlcNAc transferasa (OGT) es una enzima indispensable de los mamíferos, es responsable de regular distintos procesos celulares a través de la unión de residuos de residuos de N -acetilglucosamina (O -GlcNAc) unidos a O a proteínas nucleares y citoplasmáticas. Aún no se comprende bien la modificación de la O-GlcNAc y se necesita inhibidores de OGT permeables a las células. OSMI-1 es un inhibidor de OGT, es una pequeña molécula con detección de alto rendimiento. Es permeable a las células e inhibe la proteína O-GlcNAcilación en varias líneas celulares de mamíferos sin alterar cualitativamente los glucanos unidos a N u O de la superficie celular (Ortiz Meoz et al.,2015).

2.1.7 La O-GlcNAcilación y las enfermedades

Como se mencionó anteriormente las proteínas glicosiladas cumplen diversas funciones en un organismo. Las proteínas O-GlcNAciladas también cumplen un papel importante y existen diversos estudios que relacionan distintas patologías con un desequilibrio en la O-GlcNAcilación. La O-GlcNAcilación de proteínas cumple funciones importantes en el organismo, sin embargo, cuando esta modificación a las proteínas es crónica puede ocasionar problemas de salud severos.

Hay diversos estudios que relacionan la diabetes mellitus tipo II con problemas cardiovasculares, entre la neuropatía diabética se encuentra la neuropatía autonómica cardiovascular, que está asociada a la taquicardia en reposo, inestabilidad cardiovascular intraoperatoria, infarto al miocardio entre otras. Diversos estudios con pacientes diabéticos

evidencio un aumento en el riesgo de sufrir cualquier evento cardiovascular en pacientes que tienen neuropatía autonómica cardiovascular. (Pedrosa et al., 2019)

La O-GlcNAcilación de proteínas puede estar asociado con el estrés oxidativo en las células endoteliales. La hiperglucemia y la glucosamina pueden aumentar la producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) induciendo al estrés oxidante y disminuyendo la expresión de encimas antioxidantes. En otra investigación con células endoteliales de microvasculatura de retina humana (Células HRECs) se encontró que un incremento en la O-GlcNAcilación tiene efectos citoprotectores al reducir la producción de ERO e incrementar la expresión de enzimas antioxidantes SOD y GPx, esto sugiere que la regulación de la O-GlcNAcilación podría utilizarse como un tratamiento para enfermedades relacionadas con la hiperglucemia (Fernández Rojas et al., 2019).

El incremento de la O-GlcNAcilación se relaciona con un incremento de consumo de glucosa, como se mencionó anteriormente un incremento de nutrientes que ingresan a la HBP produce un aumento en la UDP-GlcNAc. Una de las características de las células cancerosas es que presentan un metabolismo basado en glucolisis, por lo que se ha observado en diferentes tipos de cáncer un fenómeno conocido como hiper-O-GlcNAcilación, también existe evidencia entre algunas características del cáncer como la metástasis y la angiogénesis, además de que muchos supresores tumorales están regulados por la O-GlcNAcilación (Fuentes García et al., 2021).

2.2 Rol en procesos celulares

Diversos estudios señalan que las proteínas O-GlcNAciladas están presentes en prácticamente todos los componentes celulares, y que es particularmente abundante en el núcleo donde se encuentran los mecanismos para llevar a cabo la regulación de la transcripción, como las ARN polimerasas, histonas, proteínas modificadoras de la cromatina, proteínas de biogénesis del ARNm y ADN metiltransferasas. También es abundante en proteínas relacionadas con la señalización celular, la respuesta al estrés y el metabolismo energético. La O-GlcNAcilación también se encuentra presente en las mitocondrias y en las proteínas reguladoras del citoesqueleto, como las que regulan el ensamblaje de actina y tubulina. (Zachara et al., 2022)

La O-GlcNAcilación es una modificación postraduccional que compite con el proceso de fosforilación por los mismos sitios de unión a las cadenas polipeptídicas de las proteínas, por lo que estas dos modificaciones se pueden regular mutuamente. Las enzimas que regulan la O-

GlcNAc pueden sufrir fosforilación en sus subunidades catalíticas, lo que altera su función, de igual manera, la O-GlcNAc puede regular quinasas y fosfatasas, lo que puede causar cambios de forma indirecta en la fosforilación. La O-GlcNAc se ha estudiado ampliamente en enfermedades como el cáncer, ya que la O-GlcNAc integra el flujo de nutrientes con las vías metabólicas, favoreciendo el desarrollo y mantenimiento de las células tumorales. En el sistema inmune la O.GlcNAc participa en la respuesta del sistema inmune, se sabe que NF-kB un regulador de las respuestas inflamatorias de los macrófagos es modificado por la O-GlcNAc, participa también en la diferenciación de macrófagos M1 y M2 (macrófagos proinflamatorios y antiinflamatorios).

Además la O-GlcNAcilación también participa en la movilidad de otras células del sistema inmune como los neutrófilos, donde se ha observado que al tratar estas células con N-formilmetionina-leucil-fenilalanina (un activador de fagocitos) se incrementa las proteínas O-GlcNAciladas, por otro lado, el tratamiento con PUGNAC (inhibidor de OGA) o GlcN regula el incremento de la actividad de Rac GTPasa, la cual es una molécula importante para la movilización de neutrófilos. En las células NK la O-GlcNAcilación ayuda a regular la estabilidad de EZH2 (se encarga de limitar la diferenciación y supervivencia de las células NK), así mismo las modificaciones de la O-GlcNAc en diversos factores de transcripción participan en la activación de células T, factores como NFAT, el cual es un regulador clave para la producción de IL-2 y citosinas por parte de las células T, la disminución de la expresión de OGT puede interferir en la función de NFAT e inhibir la producción de IL-2.

2.3 O-GlcNAcilación en parásitos

La O-GlcNAcilación en parásitos de *Leishmania spp* no ha sido investigado hasta el momento y no se cuenta con información clara sobre el tema, sin embargo se sabe que los parásitos de *Leishmania spp* en su forma intracelular dependen de la absorción y el catabolismo de los azucares de hexosas para su desarrollo normal dentro de los fagolisosomas, Naderer et al.(2010) realizo un estudio utilizando *L. major* donde se encontró que los parásitos intracelulares dependen significativamente de N-Acetilglucosamina y glucosamina como principal fuente de carbono, además también observo en estudios in vitro que los niveles de fosfato de hexosaminas pueden influir en la diferenciación del parásito. Sin embargo, en el mismo estudio se determinó

que la acumulación de fosfatos de hexosaminas en el glicosoma de los parásitos puede causar toxicidad e hinchazón celular y eventual lisis.

De manera que la presencia de N-Acetilglucosamina junto con los subproductos de la vía de las hexosaminas parece estar relacionado con la supervivencia del parasito. Además, la N-Acetilglucosamida también participa como precursor para la síntesis de glicoconjugados de superficie, de igual manera es necesaria para la síntesis de glicolípidos de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que son constituyentes principales de la superficie celular en *Leishmania spp*, por lo que puede servir como diana para el desarrollo de fármacos. (Chawla & Madhubala, 2010)

A pesar de que en *Leishmania spp* no hay información clara sobre la O-GlcNAcilación en *Trypanosoma cruzi* si hay información al respecto. Torres-Gutiérrez et al. (2019) realizaron un análisis de proteínas de T. cruzi, encontraron 1, 271 proteínas puntativas O-GlcNAciladas, la mayoría de estas proteínas tienen funciones estructurales y metabólicas que son necesarias para la supervivencia y desarrollo del parasito.

3. relación entre actividad tiranicida y O-GlcNAcilación

El papel de la O-GlcNAcilación en procesos celulares se ha estudiado ampliamente en células de mamíferos y otros organismos superiores, sin embargo, en parásitos protozoarios como lo son los tripanosomatidos no se cuenta con tanta información, la información disponible sugiere que esta modificación postraduccional podría estar presente también en tripanosomatidos. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, las proteínas O-GlcNAciladas participan en la activación y modulación del sistema inmune, por lo que su correcto funcionamiento también se relaciona con la actividad anti parasitaria.

Aunque no se han descubierto enzimas homologas a la OGT y OGA en *L. mexicana* y *T. cruzi* si hay investigaciones sobre otras enzimas transferasas que participan en la formación de glicoconjugados, así como la importancia de otras de las moléculas que participan en la síntesis de glicoconjugados como la UDP-GlcNAc. En Abdelwahab et al. (2012), se evaluaron inhibidores de la N-acetilglucosamina-fosfatidilinositol de N-acetilglucosamina-fosfatidilinositol de N-acetilasa (deNAc), la cual es una metaloenzima de zinc que participa en la síntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI), para la síntesis de GPI en el retículo endoplasmático inicia con la transferencia de N-acetilglucosamina (GlcNAc) de UDP-GlcNAc

al fosfatidilinositol. Por lo anterior se puede suponer que a diferencia de los organismos superiores donde la UDP-GlcNAc sirve como sustrato para la O-GlcNAc, en microorganismos como los tripanosomatidos es más utilizado para la síntesis de moléculas de superficie celular.

4. Oxadiazoles

Los compuestos oxadiazoles presentan anillos de cinco miembros formados por dos carbonos, dos nitrógenos y un átomo de oxígeno. La estructura puede formar diversos isómeros, los isómeros 1,2,4-oxadiazol, 1,2,5-oxadiazol y 1,3,4-oxadiazol tienen una amplia serie de aplicaciones farmacéuticas ya que se ha demostrado que incluirlos en los fármacos puede ayudar a mejorar su funcionamiento (Tejas et al., 2022).

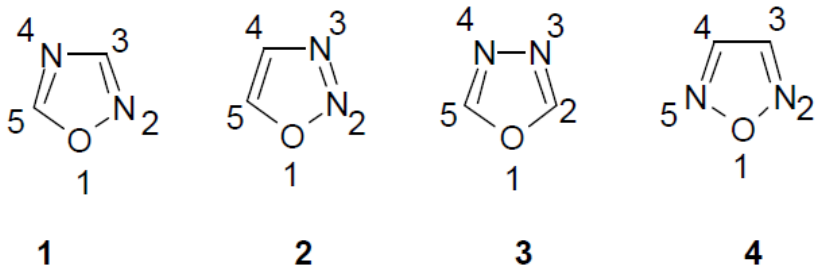


Figura 1.4 Isómeros de los de los oxadiazoles, recuperado de Tejas et al. (2022).

De estos compuestos los más utilizados durante la investigación son 1,2,4-oxadiazol y 1,3,4-oxadiazol, esto debido a sus funciones biológicas. La síntesis de estos compuestos se lleva a cabo de distintas maneras (Kayukova, 2005)(Rakesh, 20011).

Antecedentes

Las investigaciones para el tratamiento de estas enfermedades son muy variadas, desde compuestos naturales aislados de plantas hasta compuestos sintetizados desde cero. Los oxadiazoles han ganado una mayor importancia por su potencial farmacológico contra organismos infecciosos, como bacterias, hongos y protozoarios.

en 2022 se evaluó la capacidad antiparasitaria de N-ciclohexil-3-(3-metilfenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina, contra el *Trypanosoma cruzi* durante diferentes fases del ciclo de vida de la sepa y se

determinó un mayor índice de selectividad que la del fármaco de referencia (Benzinidazol), se observó que el efecto depende del tiempo de exposición y también una reducción en el número de células infectadas con amastigotes, así como una reducción en el número de amastigotes por célula (Mendes Rocha, 2022).

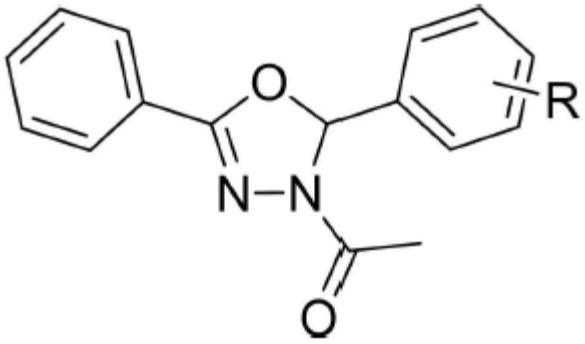
En otros estudios como los del 2017 (Pitasse santos), se utilizaron compuestos heterociclos derivados de amida natural de piperina para la síntesis de nuevos compuestos 1,2,4-oxadiazoles, en este caso probaron 14 compuestos (compuestos del 69 al 82). Con los compuestos avaluaron la CI_{50} y las alteraciones sobre el ciclo celular de dos cepas de *T. cruzi*, así como el índice de selectividad de los derivados 69-82 para epimastígote de las dos cepas frente a macrófagos y esplenocitos de ratón (Pitasse Santos, 2017).

De igual manera para el tratamiento de la leishmaniasis se han realizado diversos estudios para el desarrollo de nuevos fármacos, en Gomes Pinheiro (2024), se utilizaron técnicas in silico y para el desarrollo de nuevas moléculas oxadiazoles, que posteriormente fueron probadas en tratamientos en células RAW 264.7 contra *Leishmania braziliensis* y *Leishmania infantum*. Se encontró que las moléculas a las que denominaron 2a, 2g y 2i, presentaron una significativa actividad leishmanicida, obteniendo valores de CI_{50} de 17.95 μM, 88.83 μM y 30.86 μM respectivamente y además los compuestos 2a y 2i presentaron un índice de selectividad significativo (31.08 y 15.73 respectivamente) (Gomes Pinheiro, 2024).

Compuestos en evaluación

En este trabajo de investigación se utilizaran una serie de compuestos sintetizados por Delgado Maldonado et al. (2024). Se trata de una serie de derivados oxadiazoles que fueron elaborados a partir de N-acilhidrazona. En anteriores ya habían reportado los derivados de N-acilhidrazona como un inhibidor de agentes de T. cruzi, sin embargo, en dicho trabajo reportaron que algunos de los compuestos presentaron un efecto muy bajo o nulo, por lo que posteriormente probaron añadiendo una cadena de N-propionil que ayudo a incrementar la actividad biológica, posteriormente en Delgado Maldonado et al. (2024) realizaron otro método para incrementar la actividad biológica de los compuestos, utilizando anhidrido acético como agente de acetilación ciclación, obteniendo como producto final los compuestos Oxadiazoles, 4-acetil-1,3,4-oxadiazoles de N-Acilhidrazona y posteriormente evaluaron la actividad tripanocida en dos cepas de T. cruzi (Ninoa y A1) y en L. mexicana.

Compuestos derivados Oxadiazoles de N-Acelhidrazona



Compuesto	R
Ox-1	H
Ox-2	4-CH_3
Ox-3	4-CH_2CH_3
Ox-4	4-OCH_3
Ox-5	3,4,5-$(OCH_3)_3$
Ox-6	2-OH
Ox-7	4-OH
Ox-8	4-Fluor
Ox-9	4-Cl
Ox-10	4-Br
Ox-11	2-NO_2
Ox-12	4-NO_2

Tabla 1.4 Compuestos Oxadiazoles recuperado de Delgado Maldonado et al.(2024)

Para comprobar el potencial como inhibidor de cisteínas proteasas han realizado pruebas de Docking molecular para comprobar el acoplamiento de los compuestos oxadiazoles en el sitio activo de cruzaina de *T. cruzi* y de cisteína proteasa B de *L. mexicana*. Durante estos experimentos se comprobó el potencial de estos derivados Oxadiasoles contra *T.cruzi* y *L. mexicana*, para el Ox-7 se encontró un índice de selectividad de 1.63 y 2.42, para las cepas de

Ninoa y A1 respectivamente, mientras que para la cepa M379 de *Leishmania mexicana* se obtuvo un valor de 1.78. Los compuestos Oxadiazoles demostraron tener un gran potencial para el desarrollo de fármacos contra estos tripanosomatidos, por lo que en este proyecto de investigación se estudió el efecto de los compuestos Oxadiazoles en el modelo de amastigotes, además de evaluar también el efecto que tienen los compuestos sobre los niveles de la O-GlcNAcilación en las células infectadas por amastigotes de *L. mexicana*.

2. Capítulo II Planteamiento del problema

2.1 Planteamiento del problema

La leishmaniasis representa un severo problema de salud debido a la morbilidad y mortalidad que presentan estas enfermedades. Para el tratamiento de estas infecciones se cuenta con una limitada cantidad de fármacos. Estos medicamentos resultan ser muy tóxicos, produciendo efectos secundarios que van desde malestares intestinales hasta problemas neurológicos, además, el acceso a estos fármacos es complicado. Por lo que el tratamiento suele ser costoso y su efectividad depende de distintos factores como el tiempo que ha transcurrido desde la infección, la edad y el estado de salud del paciente. De manera que resulta de interés el desarrollo de nuevos compuestos que tengan un efecto antiparasitario y que posteriormente pueden ser utilizados para el desarrollo de nuevos fármacos.

Los parásitos responsables de estas infecciones tienen mecanismos que alteran las vías de señalización celular durante el proceso de infección, favoreciendo el progreso de la infección al inhibir funciones del sistema inmune. Por lo que se plantea la posibilidad de que el proceso de infección pueda interferir en la O-GlcNAcilación de las proteínas celulares ya que esta es una modificación postraduccional de las proteínas.

2.2 Pregunta de investigación

¿Cómo afectan moléculas con actividad farmacológica de los Oxadiazoles sobre la viabilidad de amastigotes de Tripanosomátidos (*Leishmania mexicana*) y qué impacto tienen sobre los niveles de proteínas O-GlcNAciladas en estos parásitos?

2.3 Justificación

Las leishmaniasis son difíciles de tratar debido a la falta de fármacos que garanticen un efecto sobre el parasito sin llegar a ser tóxicos para el paciente, además de que actualmente solo se conocen unos cuantos fármacos que pueden ser utilizados para el tratamiento de estas enfermedades. Por lo que es de interés el descubrimiento y desarrollos de nuevos compuestos que puedan ser utilizados para el tratamiento de estas enfermedades.

Por otro lado, las proteínas modificadas con O-GlcNAcilación regulan muchos procesos celulares: progresión del ciclo celular, control transcripcional, transducción de señales, detección de nutrientes, respuestas de estrés y remodelación de la cromatina. Estudios recientes indican que la O-GlcNAcilación influye en la dinámica celular y múltiples patologías, como la diabetes, el cáncer e incluidos también los trastornos neurodegenerativos.

2.4. Hipótesis

H0: La serie de Oxadiazoles no tendrán efecto contra los amastigotes y no interferirán con la O-GlcNAcilación de las proteínas de las células macrófagos de ratón J774.2.

H1: Al menos uno de los compuestos tendrá un efecto contra los amastigotes de tripanosomatidos y se producirá un efecto sobre la O-GlcNAcilación de las proteínas de las células macrófagos de ratón J774.2.

2.5. Objetivos

2.5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antiparasitario de una serie de moléculas con actividad farmacológica contra amastigotes de Tripanosomátidos y su impacto en la O-GlcNAcilación de las proteínas de las células infectadas.

2.5.2 Objetivos específicos

- Realizar el cultivo *in vitro* de células macrófagos J774.2, para las pruebas de los compuestos Oxadiazoles.
- Realizar el cultivo in vitro del promastigote *Leishmania mexicana*.
- Infectar a los macrófagos de ratón con el promastigote de *Leishmania mexicana* para generación de amastigote en cultivo *in vitro*.
- Extraer proteínas del cultivo de *in* vitro de la línea celular J774.2, para cuantificar las proteínas O-GlcNAciladas en estado basal sin estímulo.
- Cuantificar las proteínas O-GlcNAciladas después de los tratamientos con los Oxadiazoles después de la estimulación.

3. Capítulo III

3.1 Metodología

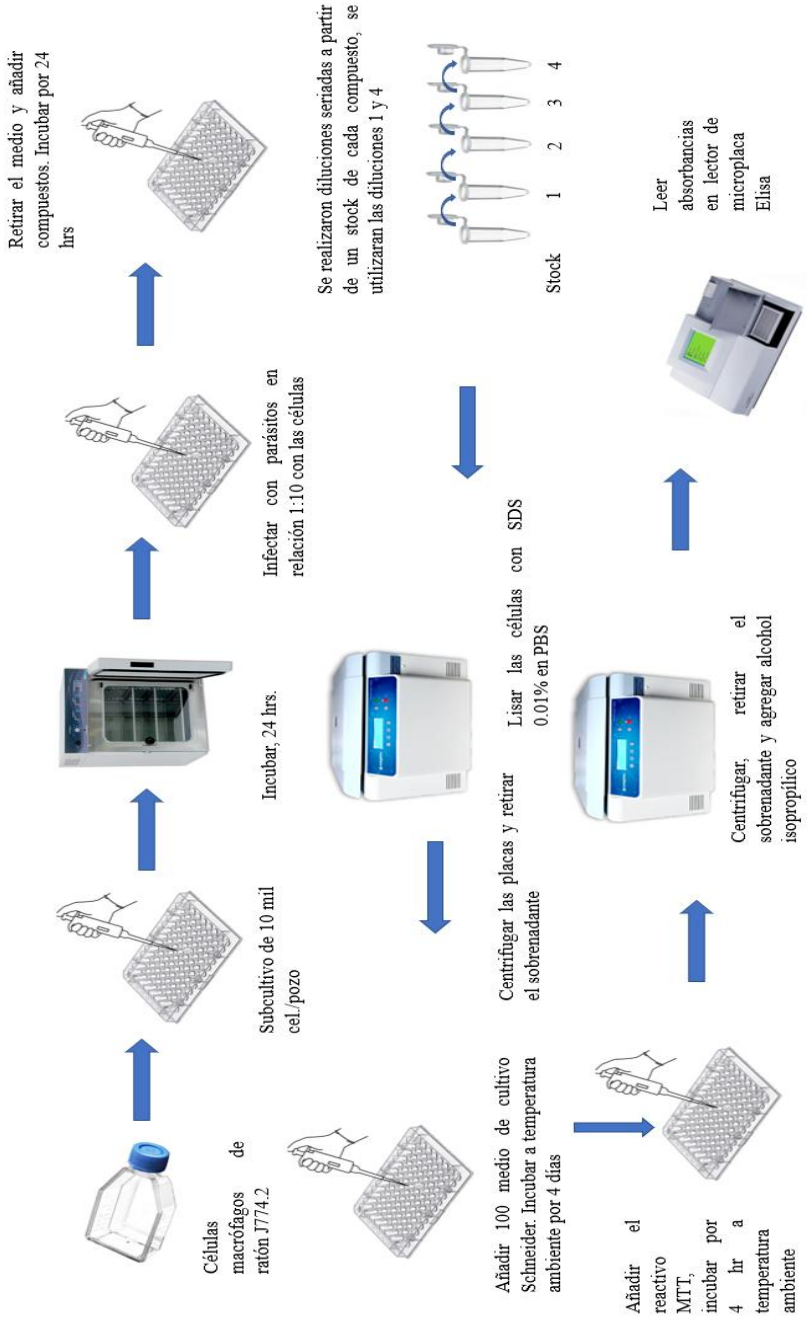


Figura 3.1 Metodología, prueba de citotoxicidad. Elaboración propia.

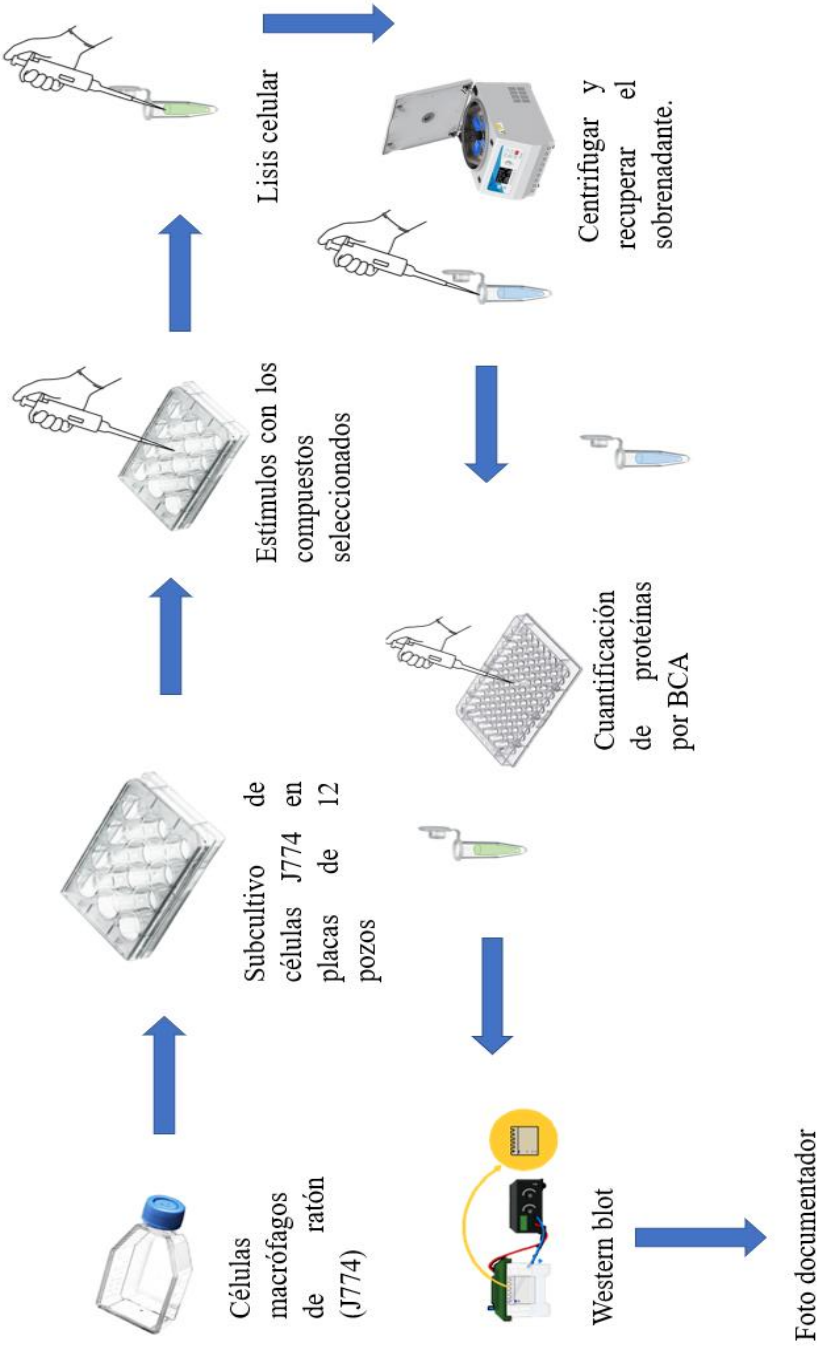


Figura 3.2 Metodología para los estímulos y cuantificación de proteínas. Elaboración propia.

3.2 Cultivo celular

La línea celular de macrófagos se cultivó en medio RPMI 1640 w/ L-Glutamina (biowest) suplementado con 5 % de suero fetal bovino (Biowest^{R}) y 1 % de penicilina/estreptomicina (AB) en frascos para cultivo celular Corning^{R} 75 cm^2, incubadora con un ambiente de humidificado al 5 % de CO_2 a 37 ºC.

Una vez alcanzada la confluencia de 90% es necesario realizar un resembrado, se despegaron las células del frasco de cultivo y se pasa el medio a un tubo falcón, posteriormente se centrifuga a 900 RCF durante 5 minutos. Al decantarse el medio de cultivo se añade 1 ml de medio completo previamente preparado y se homogeniza, para después tomar una pequeña parte y resembrarla en un nuevo frasco de cultivo.

3.3 Pruebas de citotoxicidad

Se realizó una prueba de citotoxicidad a los compuestos utilizados, para ello se utilizaron placas de 96 pocillos, en los que se sembraron células a una concentración de 10 mil cell/pozo, en un volumen de trabajo de 100 µl, después de incubarlas por 24hr a 37°C se infectaron inoculando 100 mil paracitos/pozo. Pasadas 24 hr se aplicaron los compuestos para lo que se realizaron soluciones stock, a partir de la que se realizaron diluciones seriadas de 1:2.

El medio de la placa se retiró para después ser sustituido por medio de cultivo nuevo en el que están incluidos los compuestos. Después de la incubar por 24 hr, las células fueron lisadas utilizando SDS al 0.01% en medio de cultivo RPMI, incubando por 10 min. Después del lisado se centrifugó la placa para retirar el sobrenadante y colocar en los pozos 100 µl de medio de cultivo Schneider e incubar a temperatura ambiente por 6 días.

Finalmente se utilizó el método MTT para medir la viabilidad en los paracitos. Se colocó el reactivo MTT en los pozos de las placas (20µl/pozo) y se incubo por 24 hr, para después centrifugar las placas, retirar el sobrenadante, finalmente se disolvieron los cristales en alcohol isopropílico se leyeron las absorbancias en el lector de microplacas.

3.4 Tratamientos

Para los tratamientos se sembraron $5X10^5$ células por pozo en placas de cultivo celular de 12 pozos, utilizando un volumen de trabajo de 2 ml de medio RPMI 1640 w/ L-Glutamina (biowest^R) con 5% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina (AB) en cada pozo, se dejaron crecer las células hasta una confluencia del 90%.

Una vez alcanzada la confluencia, se retiró el medio de cultivo para sustituirlo con medio nuevo con los compuestos a utilizar, se incubaron por 24 hrs para posteriormente realizar la extracción de las proteínas. Se realizaron diez tratamientos distintos los cuales están resumidos en la tabla(2).

Tratamiento	
Basal	Células J774.2
***L. mexicana,* (*L. m*)**	Células J774.2, infectadas con *Leishmania mexicana* en relación 1:10
***L. m* TMG**	Células J774.2, infectadas con *Leishmania mexicana* en relación 1:10 y con TMG en concentración de 10µM
***L. m* OSMI-1**	Células J774.2, infectadas con *Leishmania mexicana* en relación 1:10 y con OSMI-1 en concentración de 50µM
***L. m* Azaserina**	Células J774.2, infectadas con *Leishmania mexicana* en relación 1:10 y con Azaserina en concentración de 50µM
TMG	Células J774.2, con TMG en concentración de 10µM
OSMI-1	Células J774.2, con OSMI-1 en concentración de 50µM
Azaserina	Células J774.2, con Azaserina en concentración de 50µM
Ox-7	Células J774.2, con TMG en concentración de 50µM

***L. m* Ox-7**	Células J774.2, infectadas con *Leishmania mexicana* en relación 1:10 y con Ox-7 en concentración de 50µM

Tabla 3.1 Tratamientos aplicados en las células J774.2

1.4 Extracción de proteínas

La placa de cultivo celular se colocó en una hielera con refrigerantes (todo el trabajo se realizó en frio para evitar la degradación de las proteínas), se retiró el medio de cultivo de los pozos y se utilizó un mililitro de PBS para recuperar las células, con ayuda de una pipeta automática se despegaron las células y se recuperaron en tubos eppendorf. Los tubos fueron centrifugados en frio a 4000 G y 4°C por 10 minutos, después se eliminó el sobrenadante y en cada eppendorf se colocaron 35µl de buffer de lisis RIPA. Las muestras se mantuvieron en frio por 15 minutos y se agitaban constantemente por 3 segundos, después fueron centrifugadas a 12000 G y 4°C por 10 minutos, posteriormente se desechó el botón de residuos y se recuperó el sobrenadante y se guardó en congelación a -20°C. Las muestras almacenadas se utilizaron después para la cuantificación de proteínas.

3.5 Cuantificación de proteínas por BCA

Para la cuantificación de proteínas se realizó una curva de calibración para la cuantificación de proteínas con albumina de suero bovino (BSA), en concentraciones de: 0, 0.125, 0.50, 0.75, 1, 1.5 y 2 µg/µl.

Para la cuantificación de proteínas se utilizó una placa de 96 pozos, en la que se colocaron 10 µl de cada concentración de la curva de calibración (todo se realizó por duplicado), para la concentración cero se utilizaron 10 µl de buffer de lisis. Para las muestras de proteínas celulares, se hicieron diluciones 1 a 10, se tomó un microlitro de la muestra y se añadieron 9 µl de buffer de lisis, las muestras también se colocaron por duplicados en la placa de 96 pozos. Posteriormente se colocaron 200µl del reactivo AB para la cuantificación de proteínas (relación 1:50 de los reactivos A y B del kit BCA assay and lowry assays, pierce BCA protein assays), posteriormente la placa se incubo a 37°C durante 30 minutos en oscuridad para evitar la

degradación del reactivo. Finalmente se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro de microplacas a 562nm y con los datos se determinó la cantidad de proteínas.

3.6 Western blot

3.6.1 Preparación de la muestra

Las muestras se preparan mezclando la muestra, buffer de muestra laemmli 6X y agua inyectable, los volúmenes tomados de cada uno se determinan a partir de la cuantificación de proteínas, por lo que se realizó lo siguiente. Las muestras de proteínas extraídas de cada tratamiento fueron descongeladas y homogenizadas con agitación en vortex, se mantuvieron en frio para poder preparar las muestras, a partir de los cálculos realizados en la cuantificación de proteínas, se determinaron los volúmenes necesarios para tener la misma concentración de proteínas en cada muestra (25µg) y a partir del volumen de muestra más grande se determinó la cantidad de buffer de muestra a tomar, de manera que la concentración final del buffer de muestra en cada una de ellas fue de 1x y el volumen utilizado de este buffer en cada muestra fue el mismo, la diferencia de volumen en cada muestra fue cubierta con agua. Posteriormente las muestras se calientan a 98 °C durante 5 minutos en el calentador de bloque seco para ser usadas en el western blot. En la tabla (3) se muestra un ejemplo del cálculo de volúmenes para la preparación de las muestras la fila resaltada indica la muestra de mayor volumen que sirve de guía para saber que cantidad de buffer de muestra 6X se colocara en todas las muestras y el volumen total de la muestra es de 13.43 µl.

V muestra µl	V Buffer 6X µl	V agua µl	V total µl
6.59	2.24	4.60	13.43
5.25	2.24	5.94	13.43
5.58	2.24	5.61	13.43
11.20	2.24	00	13.43
3.73	2.24	7.46	13.43
6.25	2.24	4.94	13.43
7.15	2.24	4.04	13.43
5.20	2.24	5.99	13.43
4.51	2.24	6.68	13.43
5.85	2.24	5.34	13.43

Tabla 3.2 Volúmenes para la elaboración de muestras.

3.6.2 Electroforesis (SDS-PAGE)

Para la electroforesis se prepararon dos geles, el gel separador con 10% de poliacrilamida y el gel concnetrador con 4% de poliacrilamida, se preparo el equipo y se relleno la camara interna con buffer de corrida. Se cargo uno de los pozos con 3 µl de marcador de peso molecular y a continuación se colocaron las 10 muestras en los pozos, los 4 pozos sobrantes se rellenaron con 5 µl de buffer de muestra 6X. Una vez colocadas todas las muestras se comienza la electroforesis con un voltaje de 70 voltios durante 30 minutos para que la muestra atraviese el gel concentrador, a continuación, el voltaje se incrementa a 120V hasta terminar el proceso. La electroforesis termina hasta que el frente de corrida, visible por el azul de bromofenol (presente en el buffer de muestra) alcanza el final del gel en un Mini-Protean^{R} Tetra Cell Bio-Rad.

3.6.3 Transferencia

Terminada la electroforesis se recuperaron los geles y se colocaron en un recipiente con buffer de transferencia y se colocaron en agitación por diez minutos, se realizó lo mismo con las membranas de PVDF, para lo cual primero se les dio un tratamiento con etanol para volverlas permeable al agua, y luego se enjuagaron con agua destilada para retirar los restos de alcohol. La transferencia se realizó en un Mini Trans-Blot^{R} Cell Bio-Rad en frio y constante agitación, con 30V durante 16 horas. Para la transferencia se sumergieron las esponjas y papel filtro en una bandeja con buffer de transferencia, posteriormente se armó el arreglo de los componentes en el siguiente orden: colocando primero, la parte oscura del caset en la parte de abajo, luego una esponja, el papel filtro, el gel, la membrana, luego un segundo papel filtro y finalmente otra esponja. Todo se realizó dentro de la bandeja, sumergiendo todo en buffer de transferencia y asegurando que no quedaran burbujas atrapadas entre la membrana y el gel. Finalmente, todo se acomodó dentro del caset y se depositó en la cámara de transferencia que se rellenó con buffer de transferencia para comenzar el proceso.

3.6.4 Inmunodetección

Después de la transferencia se recuperaron las membranas y se enjuagaron con TBST 1X, manteniendo las membranas en agitación durante 10 min, se realizaron tres lavados. Posteriormente las membranas fueron teñidas con rojo de Ponceau, para visualizar las bandas de proteínas y recortar la membranas para retirar las parte innecesarias, a continuación, las membranas fueron bloqueadas con leche descremada en polvo al 5 % en TBST 1X durante 1 hora.

Después del bloqueo se incubo el anticuerpo primario para O-GlcNAc: anti-O-Linked N-Acetylgucosamina (RL2) de Abcam (proteínas O-GlcNAciladas) dilución 1:1000. La incubación se realizó durante toda la noche a 4 ºC. Terminando la incubación se recuperó el anticuerpo primario y se guardó en congelación, se realizaron tres lavados con TBST en agitación de10 min cada uno. Terminando los lavados se comenzó con la incubación del anticuerpo secundario: Goat anti-mouse IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) de Abcam en dilución 1:10000. La incubación se realizó por una hora para después recuperar el anticuerpo y guardarlo en congelación, posteriormente se realizaron tres lavados con TBST de 10 minutos con agitación constante para retirar los restos de anticuerpos. A continuación, se trató la membrana con la mezcla reveladora, una mezcla de luminol y peróxido en proporciones 1:1, para después llevar la membrana a revelar en el fotodocumentador (ImageQuant LAS 500, GE Healthcare).

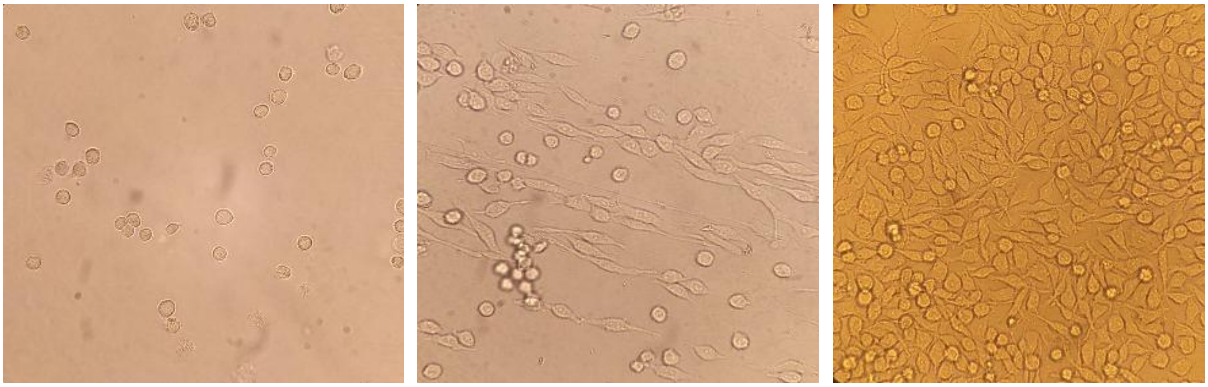
Posteriormente se realizaron tres lavados más con TBST para después realizar un lavado de 30 minutos con la solución de Stripping, y finalmente las membranas se volvieron a lavar con TBST para dejar las membranas listas para la incubación de los siguientes anticuerpos para revelar β-actina. El anticuerpo primario Rabbit anti- β-actina en dilución 1:10000 y el anticuerpo secundario Goat Anti Rabbit IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) en dilución 1:10000, estos anticuerpos fueron incubados siguiendo el mismo procedimiento.

Las imágenes generadas por el fotodocumentador fueron analizadas utilizando el software Image Lab 6.1 BIO-RAD, los resultados se normalizaron a β-actina y se utilizó el Software GraphPad Prism 8 para el análisis estadístico (Anova para la comparación de madias de múltiples grupos y T de Student para comparar medias de dos grupos).

4. Capitulo IV Resultados

4.1 Cultivo de células macrófagos de ratón J774.2

Las células macrófagos de ratón J774.2 crecieron adecuadamente en medio de cultivo RPMI 1640 w/ L-Glutamina (Biowest^{R}), en las placas de cultivo se obtuvo la confluencia del 90% en una semana como promedio.



a) b) c)

Figura 4.1 Células macrófagos de ratón J774 creciendo en RPMI, a) sembradas recientemente, b) Células ya adheridas, c) células en 90% de confluencia.

Se realizo un pequeño ensayo para observar la infección de los paracitos *Leishmania mexicana*. Tal y como se muestra en las siguientes imágenes.

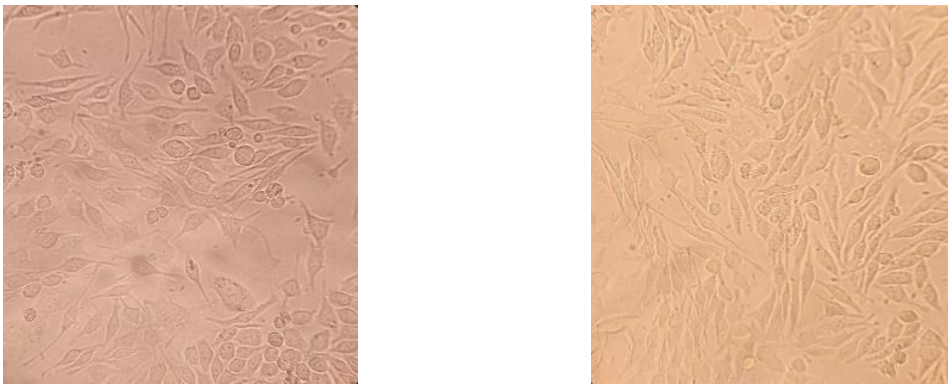


Figura 4.2 Células J774 infectadas con *Leishmania mexicana.*

4.2 Primer ensayo de citotoxicidad

En el primer ensayo de citotoxicidad se probó el efecto citotóxico de los 12 compuestos oxadiazoles, sobre los amastigotes de parásitos (*Leishmania mexicana*), se realizaron cuatro diluciones y se utilizaron solo la primera y la penúltima. Se realizo un ensayo de MTT para obtener la viabilidad celular y se seleccionaron los oxadiazoles que tuvieron una mejor respuesta para utilizarlos en el siguiente experimento, los compuestos elegidos fueron los siguientes: Ox3, Ox4, Ox5, Ox6, Ox7, Ox8, Ox9, Ox11 y Ox12.

4.3 Segundo ensayo de citotoxicidad de compuestos oxadiazoles

Para el segundo ensayo de citotoxicidad se utilizaron los oxadiazoles, Ox3, Ox4, Ox5, Ox6, Ox7 Ox8, Ox9, Ox11 y Ox12 contra *Leishmania mexicana*. En esta ocasión se realizaron 4 diluciones a partir de la solución stock.

Al igual que en el ensayo anterior, se evaluó la viabilidad celular para seleccionar los compuestos que fueron utilizados durante los estímulos con oxadiazoles durante la infección con los amastigotes, en la figura (10) se observa que el menor porcentaje de viabilidad se obtuvo con el compuesto Ox7 con los amastigotes de *Leishmania mexicana*.

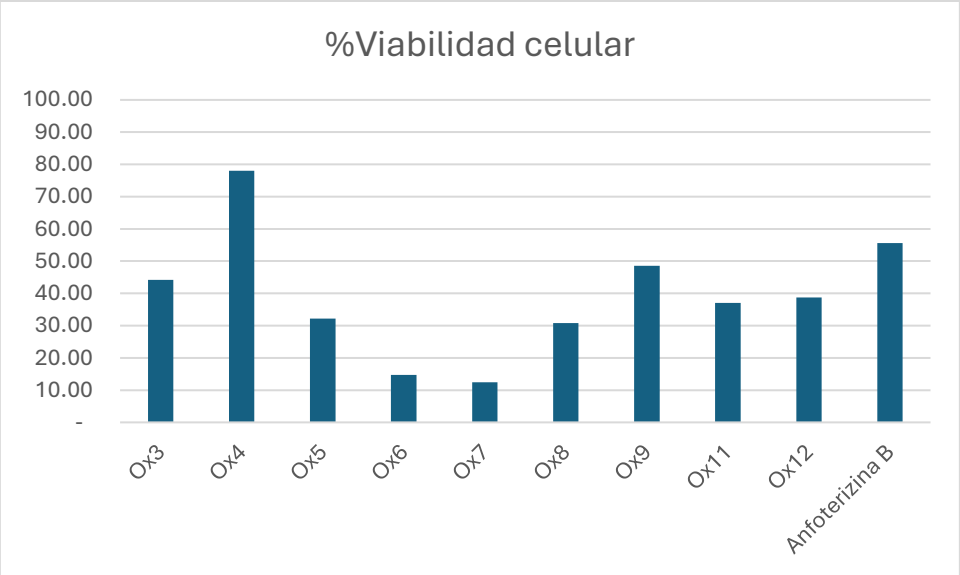


Figura 4.3 Porcentaje de viabilidad celular de *Leishmania mexicana.*

4.4 Segundo ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular

En la figura (12), se observan los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en el segundo ensayo, se observa que el Ox9 sobrepasa el 100% lo que puede indicar un error en la lectura.

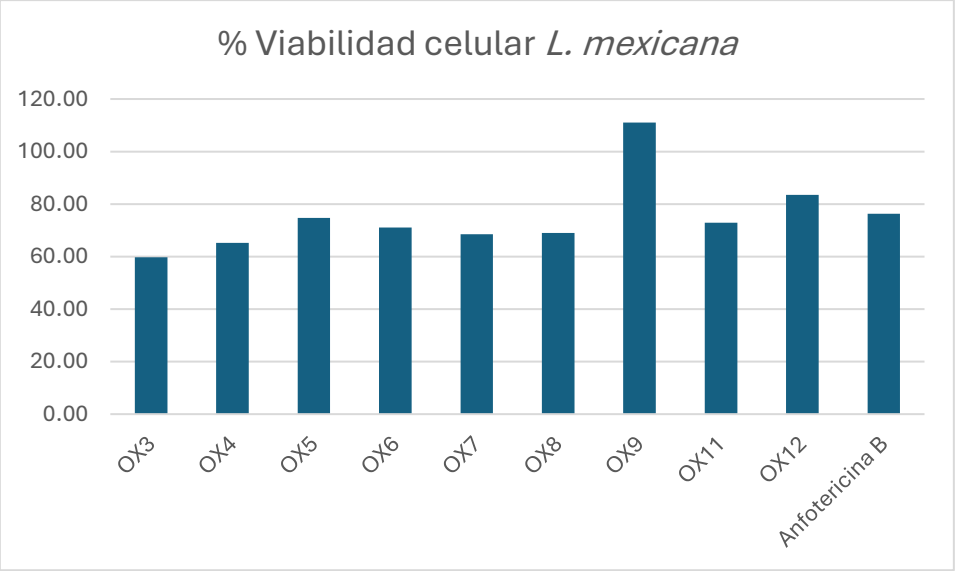


Figura 4.4 Porcentaje de viabilidad celular de *Leishmania mexicana* segundo ensayo.

4.5 Cálculos de la CI50

Se realizo el cálculo de la CI50, a partir de los datos de viabilidad celular obtenidos del ensayo de MTT, los datos obtenidos se encuentran resumidos en las tablas. En la tabla (4) se encuentran los valores de la CI50 para los fármacos de referencia, y en la tabla (5) se encuentran los valores calculados para los oxadiazoles.

Compuesto	CI_{50} en µM
Ox3	28.08
Ox4	53.59
Ox5	83.97
Ox6	75.26
Ox7	94.72
Ox8	95.15
Ox9	503.2
Ox11	297.9
Ox12	363.5

Tabla 4.2 CI_{50} calculadas para los oxadiazoles vs amastigotes de *L. mexicana.*

Fármaco vs *L.mexicana*	CI_{50} en µM
Glucantime	603.64
Meglumina	5.928
Anfotericina B	64.679

Tabla 4.1 CI_{50} calculadas para los fármacos de referencias vs amastigotes de *L. mexicana*.

4.6 Estímulos con los compuestos Ox 7 contra *Leishmania mexicana*

Para evaluar el efecto de la infección con *Leishmania mexicana,* así como el efecto que tiene el uso del Oxadiazol 7 para tratar la infección, sobre la O-GlcNAcilación de las proteínas celulares, se realizaron estímulos en una placa de cultivo de 12 pozos en donde se dejaron incubando las células con los distintos tratamientos durante 24 hrs. Para después recuperar las células y extraer las proteínas, seguidamente se prepararon muestras para la cuantificación de proteínas por el método BCA. Para la cuantificación de proteínas se realizó una curva de calibración.

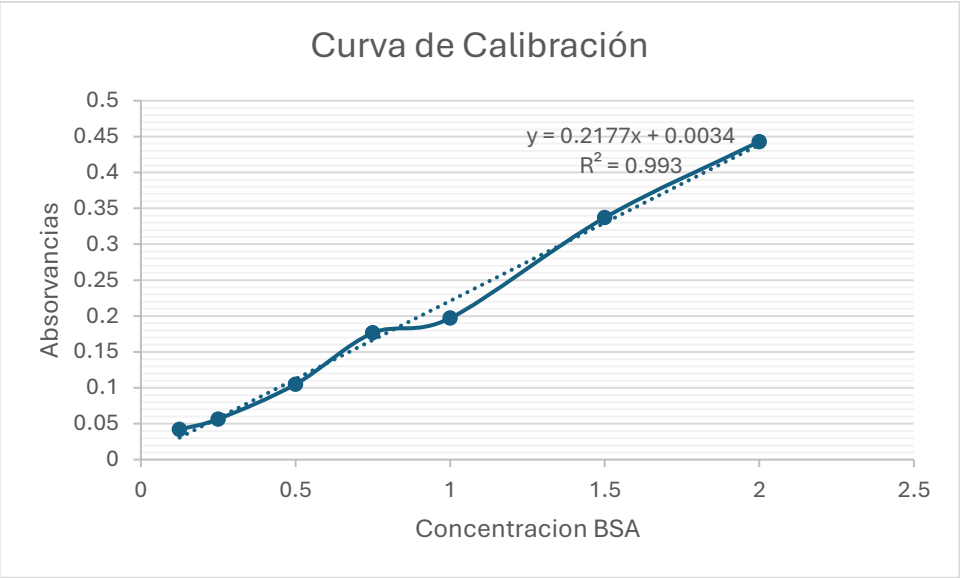


Figura 4.5 Curva de calibración para la cuantificación de proteínas usando como estándar albumina sérica bovina

A partir de esta curva de calibración se realizó la cuantificación de proteínas, y una vez realizados los cálculos se prepararon las muestras con 25µg de proteínas celulares, como se puede ver en la tabla 2, cada muestra se preparó con el mismo volumen y la misma concentración de proteínas.

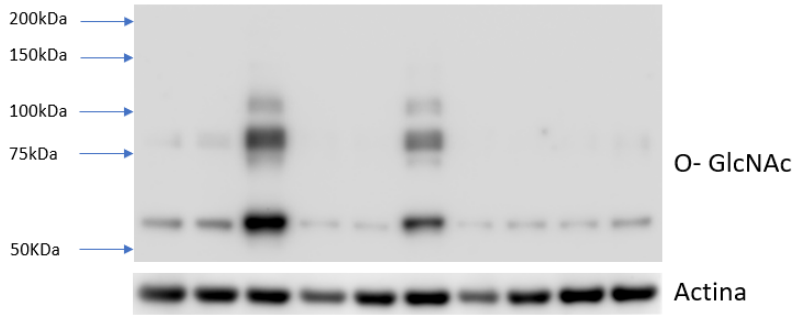
	Volumen muestra (µl) Para tener 25 µg de proteínas	**Volumen Buffer Muestra 6X**	**Agua**
Basal	3.7	1.08	1.69
L.mexicana	4.0	1.08	1.38
L.mexicana+TMG	3.8	1.08	1.59
L.mexicana+Osmi 1	5.4	1.08	0.04
L.mexicana+Azaserina	2.9	1.08	2.50
TMG	3.2	1.08	2.23
Osmi-1	4.9	1.08	0.49
Azaserina	2.8	1.08	2.65

Ox7	3.5	1.08	1.92
L.mexicana+Ox7	3.3	1.08	2.08

Tabla 4.3 Volúmenes utilizados en la preparación de muestras para la electroforesis

Electroforesis y western blot

Para la electroforesis se prepararon geles de poliacrilamida al 10% y se colocaron en los pozos las muestras preparadas de cada uno de los tratamientos. Después de la electroforesis, se utilizaron membranas de PVDF para la electrotranferencia y se incubaron anticuerpos anti O-GlcNAc y anticuerpos para leer actina. Se revelaron las membranas con lo que se obtuvieron las siguientes imágenes, donde se puede observar la O-GlcNAcilación de las proteínas en cada tratamiento y la actina como control de muestra. Con las imágenes posteriormente se realizará el análisis de densitometría para obtener el porcentaje de O-GlcNAcilación, comparando el resultado de cada tratamiento con la muestra basal.

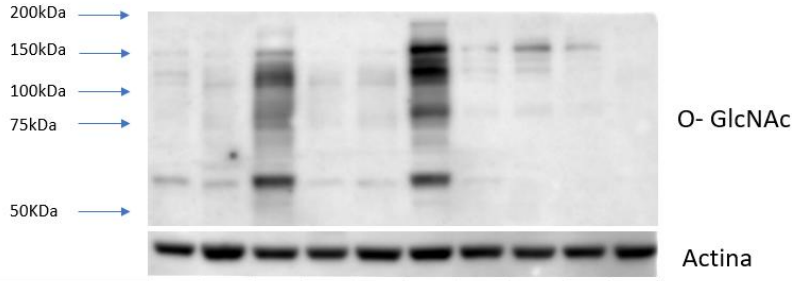


L. mexicana	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
TMG	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
OSMI-1	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Azaserina	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
OX-7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Figura 4.6 Proteínas O-GlcNAciladas durante los estímulos.

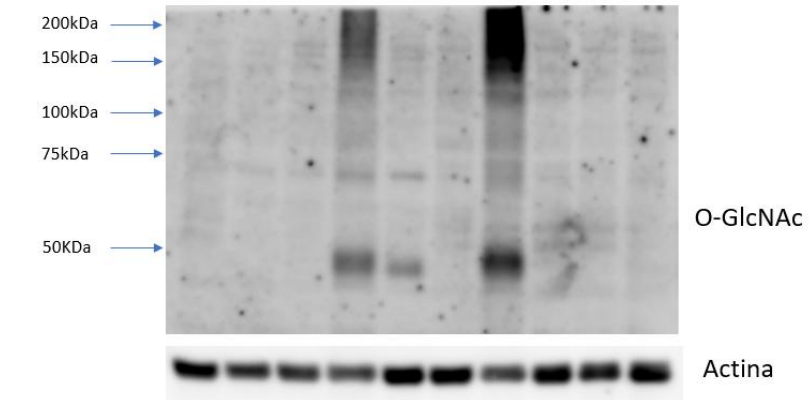
Este procedimiento se realizó de la misma manera para las muestras de las réplicas del experimento y se obtuvieron las siguientes imágenes, en las figuras 14, 15 y 16 los símbolos (+)

y (-), indican las combinaciones de variables en los tratamientos, así por ejemplo en la figura (14) en el primer carril solo hay símbolos (-) por lo tanto en esa muestra se encuentran proteínas extraídas solo de células J774.2 que no recibieron ningún otro estimulo, y en el tercer carril se encuentran símbolos (+) en *L. mexicana* y TMG, por lo que en ese carril se depositó la muestra de proteínas extraídas de células J774.2, que fueron estimuladas con TMG e infectadas con parásitos *L. mexicana*.



L. mexicana	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
TMG	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
OSMI-1	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Azaserina	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
OX-7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Figura 4.7 Proteínas O-GlcNAciladas durante los estímulos, primera replica.



L. mexicana	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
TMG	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
OSMI-1	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Azaserina	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
OX-7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Figura 4.8 Proteínas O-GlcNAciladas durante los estímulos, segunda replica.

En las figuras se observa el perfil de proteínas O-GlcNAciladas presentes en las muestras, se observa que en las tres figuras los carriles correspondiente al tratamiento con TMG hay una mayor presencia de proteínas O-GlcNAciladas, mientras que en los carriles correspondientes al tratamiento con OSMI-1 no se observan bandas oscuras, solo el complejo de bandas tenues y opacas ocurre lo mismo en las muestras de los tratamientos con Azaserina. Por otro lado, las bandas de actina muestran la misma intensidad en cada una de las imágenes.

Análisis de densitometría

Las imágenes obtenidas del foto documentador fueron analizadas en el programa Image Lab 6.1 de BIO-RAD, para el análisis de densitometría se recuperaron los datos sobre la densidad de pixeles. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 8.4.2(679) para realizar el análisis estadístico ANOVA, para comparar las medias de múltiples grupos y la prueba de T de student para comparar las medias de dos grupos. En la gráfica (figura 20) se puede observar las diferencias entre medias de cada tratamiento, existe una diferencia

significativa entre las barras correspondientes a los tratamientos con *L.m* TMG, TMG y la columna de la muestra basal. En la tabla (7) se muestran las diferencias entre las medias calculado en GraphPad Prism 8.4.2(679), la diferencia de las medias de la muestra basa y *L.m* TMG es de 11.56, mientras que la diferencia de medias de la muestra basal y TMG es de 12.24, estas son las únicas comparaciones en las que existe una diferencia significativa.

Dunnett's multiple comparisons test	Diferencia de medias	95.00% CI of diff.	Significant?
Basal vs. L.m	-0.6761	-6.367 to 5.014	No
Basal vs. L.m TMG	-11.56	-17.25 to -5.872	Yes
Basal vs. L.m OSMI-1	-0.09494	-5.786 to 5.596	No
Basal vs. L.m Azaserina	-0.2375	-5.928 to 5.453	No
Basal vs. TMG	-12.24	-17.93 to -6.550	Yes
Basal vs. Osmi-1	0.02726	-5.663 to 5.718	No
Basal vs. Azaserina	-0.9366	-6.627 to 4.754	No
Basal vs. Ox-7	-0.1346	-5.825 to 5.556	No
Basal vs. L.m Ox-7	0.08485	-5.606 to 5.775	No

Tabla 4.4 Resultados del análisis Anova para comparar media de múltiples grupos, exportada de GraphPad Prism 8.

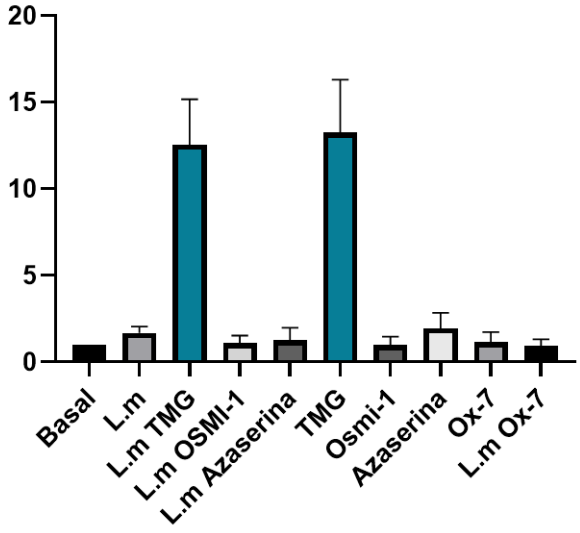


Figura 4.9 Comparación de las medias de proteínas O-GlcNAciladas.

Se realizo una prueba de T de student para comparar las medias de la muestra basal con las muestras correspondientes a los tratamientos, *L.m* TMG y TMG. Para la comparación de las muestra basal y la muestra *L.m* TMG se calculó un valor de t= 4.424 y p=0.0475, por lo que la hipótesis nula (H0= las medias de los dos grupos son iguales) fue rechazada y para la comparación del grupo Basal y TMG se obtuvo un valor de t=3.994 y p=0.0162.

Discusión

Los compuestos oxadiazoles utilizados han demostrado tener un efecto contra los amastigotes de *L. mexicana*, en los resultados obtenidos de viabilidad celular durante el primer ensayo se observó que los oxadiazoles: Ox3, Ox5, Ox6, Ox7, Ox8, Ox9, Ox11,Ox12, redujeron en menos del 50% la viabilidad celular (Fig. 11), obteniéndose el mejor resultado en Ox6 y Ox7 que se mantuvieron por debajo del 15% de viabilidad celular. Sin embargo, en el segundo ensayo los valores obtenidos son distintos (Fig. 13), en el segundo ensayo los oxadiazoles 6 y 7 obtuvieron un porcentaje de viabilidad del 70%.

Para los cálculos de la CI50, el Ox3 obtuvo el mejor resultado con un valor de 28.08µM, seguido del Ox4 (53.59 µM), estos oxadiazoles fueron los que tuvieron un mejor resultado en comparación con los demás, los oxadiazoles 9, 11 y 12 tuvieron un valor de CI50 muy alto,

503.2, 297.9 y 363.5 respectivamente. Por otro lado, para los fármacos de referencia meglumina y anfotericina B se calcularon valores de 5.928 μM y 64.679 μM respectivamente, se obtuvieron valores bajos en comparación con el Glucantime que obtuvo un valor de 603.64 μM.

En Maldonado et al.,(2024), se reportó un valor de CI50=33.8±7.37μM para el Ox3 en un modelo de promastigotes, por lo que el valor obtenido de 28.08μM se encuentra dentro del mismo rango, sin embargo, en los oxadiazoles 11 y 12 reportaron valores de CI50 de 86.7±18.0 y 10.0±14.2μM respectivamente, estos valores contrastan con los valores obtenidos, sin embargo, hay que recordar que para este trabajo se utilizó el modelo de amastigotes, por lo que existe una diferencia en la forma en que el compuesto pueda ingresar a la célula y al paracito.

En cuanto a los Oxadiazoles 6 y 7, Maldonado et al. (2024), reporto un valor de CI50 de 55.5±4.38μM y 55.9±3.56μM, aunque existe una notable diferencia ente el valor obtenido en este trabajo y el reportado por Maldonado et al. para Ox7, el valor reportado en dicho artículo para el Ox6 es más cercano al obtenido, que fue de 75.26 μM.

Para los análisis de O-GlcNAcilación de proteínas se decidió utilizar Ox7 para estudiar el efecto que tienen los oxadiazoles en los niveles de O-GlcNAcilación, en la tabla 2 se pueden ver los 10 tratamientos realizados, y en la gráfica (Fig. 20) se tiene una representación visual del efecto que tubo cada tratamiento en los niveles de O-GlcNAcilación, en la tabla se puede observar que los únicos tratamientos que tuvieron una diferencia significativa con los demás y principalmente con la muestra basal, fueron los tratamientos con TMG, que es un inductor de la O-GlcNAc.

5. Conclusiones y recomendaciones

Los compuestos oxadiazoles utilizados en este trabajo demostraron tener un efecto contra los amastigotes de *Leishmania mexicana*, esto sugiere su posible uso para el desarrollo de fármacos contra la leishmaniasis, sin embargo en los experimentos realizados se obtuvo variación muy alta entre ensayos, como se observó en los ensayos de citotoxicidad la desviación estándar en los datos fue muy alta, esto se puede deber a distintos factores como el error humano, y debido a que en el ensayo de MTT los datos son una relación directa entre la viabilidad celular y la absorbancia, los resultados dependen de la correcta manipulación de todos los elementos durante la práctica, se sugiere corregir los pequeños errores en el pipeteo y el tiempo de incubación necesario para que el paracito infecte las células y se formen los amastigotes, además los restos celulares que quedan en los pozos después de lisar las células generan errores al tomar las lecturas de absorbancias.

En cuanto a los estímulos realizados, no se observó una diferencia significativa entre los niveles de O-GlcNAcilación e los distintos tratamientos, los niveles de O-GlcNAc en la muestra de células infectadas con *L. mexicana* no presentaron una diferencia significativa con la muestra basal. Además en los tratamientos que incluyeron Ox7, tampoco se observa una diferencia significativa con la muestra basal o con los otros tratamientos, sin embargo si tomamos por ejemplo la gráfica (Fig. 18) podemos observar que existe diferencia entre las medias de los tratamientos obtenidas en los experimentos realizados, sin embargo podemos ver también que la desviación estándar es muy alta, a pesar de los niveles de O-GlcNAcilación en el tratamiento con *L. mexicana* es de más de 1.5 veces la obtenida en la muestra basal, estadísticamente no se obtiene una diferencia significativa en el análisis ANOVA para comparar medias de múltiples grupos, esto posiblemente a que la desviación estándar es muy alta. Por lo tanto, se sugiere un mayor número de ensayos y mantener las mismas condiciones de cultivo y mismas condiciones de tratamientos para mantener un mayor control en las variables que pudieran afectar a los resultados.

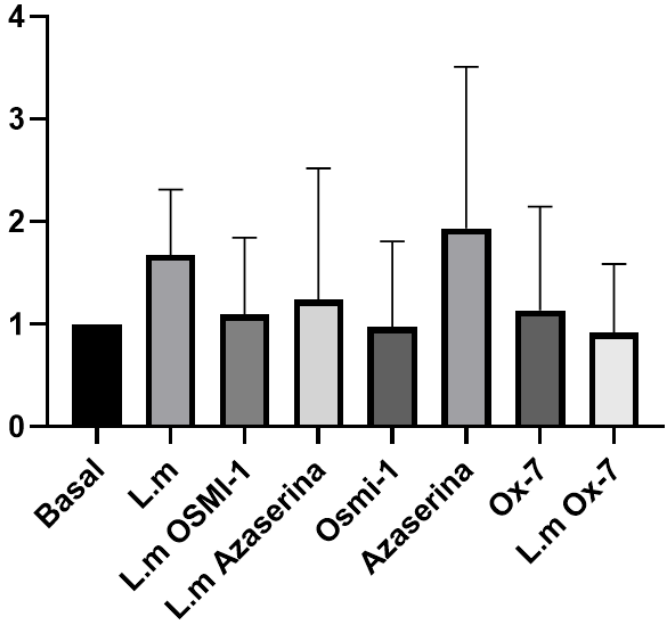


Figura 5.5.1 Comparación de las medias entre tratamientos omitiendo el tratamiento con TMG.

Un mayor número de ensayos independientes puede no ser suficiente para reducir la desviación estándar entre cada ensayo, sin embargo, en combinación con un control más estricto de las variables puede servir para reducir las diferencias entre cada ensayo. Por otro lado, el tratamiento con Azaserina muestra niveles de O-GlcNAcilación de casi dos veces lo obtenido en la muestra basal, la Azaserina debería disminuir la cantidad de O-GlcNAcilación, por lo que se sugiere también para futuros trabajos repetir los ensayos con Azaserina para recopilar más datos sobre la interacción de la Azaserina y la O-GlcNAcilación durante la infección con *L. mexicana*.

Referencias

Delgado-Maldonado, T., Moreno-Rodríguez, A., González-Morales, L. D., Flores-Villegas, A. L., Rodríguez-González, J., Rodríguez-Páez, L., ... & Rivera, G. (2024). Design, Synthesis, and In Vitro and In Silico Evaluation of 1, 3, 4-Oxadiazoles as Anti-Trypanosoma cruzi and Anti-Leishmania mexicana Agents. ChemMedChem, 19(23), e202400241.

Leishmaniasis. (2024, October 21). OPS/OMS | Organización Panamericana De La Salud. https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis

Bond MR, Hanover JA. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. J Cell Biol. 2015; 208:869-80.

Juárez, J. H., Gallegos, B., Mayoral, E. P. C., Campos, E. P., Pina, S., & Cruz, P. H. (2017). Efecto de la hiperglucemia en la actividad plaquetaria. Revista de Educación Bioquímica, 36(2), 55-64.

Fraga Nodarse, J., Montalvo Alvarez, A. M., Van der Auwera, G., Dujardin, J. C., Requena, J. M., Deborggraeve, S., ... & De Doncker, S. (2021). Aportes a la evolución y clasificación taxonómica de los géneros de importancia médica de la familia Trypanosomatidae basado en el análisis filogenético del gen de la proteína de choque térmico 70. Anales de la Academia de Ciencias de Cuba, 11(1).

Llop, D. (2001). Microbiología y parasitología medica: tomo III" ciudad de La Habana.

OMS. Obtenido de Organización Mundial de la Salud. 2023: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis

Vargas Martínez F, Torres Guerrero E, Arenas R, Quintanilla Cadillo MR. Leishmaniasis en México. 2011; 39(4): 163-183.

Secretaria de Salud. Guía para la Atención Médica de la Leishmaniasis en México. Primera edición julio 2022

Calvay-Sánchez KD, Rojas-Palomino ND, Sandoval-Juárez AC, Cisneros-Tarmeño A, Obregón-Cahuaya C, Minaya-Gómez GS. Capacidad infectiva de promastigotes en fase estacionaria de Leishmania (Viannia) braziliensis y Leishmania (Viannia) peruviana, en línea celular DH82. Rev. Perú Med Exp Salud Publica. 2015;32(1):33-40.

Pacheco, O. F. M., Llanes, D. A. M., Téllez, E. A. R., & Vera, A. C. (2023). Influencia del cambio climático sobre la transmisión de leishmaniasis en Latinoamérica y el estatus de la investigación en México. Revista Biomédica, 34(1), 44-58.

Lazar, L. T. Y., & Abass, K. S. (2020). Morphology, life cycle, pathogenesis and virulence factors of genus Leishmania: a review.

Peña-Callejas, G., González, J., Jiménez-Cortés, J. G., Fuentes-Vicente, J. A. D., Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., ... & Flores-Villegas, A. L. Enfermedad de Chagas: biología y transmisión de Trypanosoma cruzi. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas. 2022; 25: 1-19

OPS. Obtenido de Organización Panamericana de Salud: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)

Murillo-Godínez, G. (2018). Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Medicina interna de México, 34(6), 959-970.

Warner APT B, Zulantay A. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Rev. Med Chile. 2011; 139: 247-257.

Secretaria de Salud. Manual de procedimientos para la enfermedad de Chagas en México. 2019

inmunosupresion. Diccionario médico. (n.d.). https://www.cun.es. https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/inmunosupresion

Rosales-Borjas, D., & Ortiz-Ortiz, L. (2008). Infecciones parasitarias: mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Revista Médica de La Extensión Portuguesa–ULA, 2, 89-98.

Fernández-Figueroa, E. A., Muñoz-Moreno, S. A., Ríos-Muñoz, C. A., Becker, I., & Rangel-Escareño, C. (2022). Perfil proteico de aislados de Leishmania mexicana con diferente virulencia. REVISTA BIOMÉDICA, 34(1).

Olivier, M., Atayde, V. D., Isnard, A., Hassani, K., & Shio, M. T. (2012). Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. Microbes and infection, 14(15), 1377-1389.

Al-Khalaifah, H. S. (2022). Major molecular factors related to leishmania pathogenicity. Frontiers in Immunology, 13, 847797.

Torres-Guerrero, E., & Arenas, R. (2018). Leishmaniasis. Alternativas terapéuticas actuales. Dermatol Rev Mex, 62(5), 400-409.

Moncada-Diaz, M. J., Rodríguez-Almonacid, C. C., Quiceno-Giraldo, E., Khuong, F. T., Muskus, C., & Karamysheva, Z. N. (2024). Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Leishmania spp. Pathogens, 13(10), 835.

World Health Organization: WHO. (2025, April 2). Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)

Ponte-Sucre, A. (2020). ADAPTABILIDAD DE LEISHMANIA Y SU IMPLICACIÓN EN LA RESISTENCIA A DROGAS. Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales, 30.

Chakravarty, J., & Sundar, S. (2010). Drug resistance in leishmaniasis. Journal of global infectious diseases, 2(2), 167-176.

Fernández–Rojas, B., Hernández–Juárez, J., Gallego–Velasco, I. B., García-Cruz, L. M., & Hernández–Cruz, P. A. (2019). El papel de la O-GlcNAcilación en el estrés oxidativo y la disfunción endotelial. Revista de Educación Bioquímica (REB), 38(3), 72-82

Kim, E., Kang, J. G., Jho, E. H., Yang, W. H., & Cho, J. W. (2022). O-GlcNAcylation: an emerging protein modification regulating the hippo pathway. Cancers, 14(12), 3013.

RAMIREZ, I. M. D. (2022). Análisis de glicoproteínas.

Bürgi, M. D. L. M., Perelmuter, K., Cutine, A., Attallah, C., Oggero, M., Fontana, D., ... & Mohana–Borges, R. (2021). Glicoproteínas terapéuticas: diseño, expresión en células de mamífero y análisis de sus glicanos

Zeidan, Q., & Hart, G. W. (2010). The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. Journal of cell science, 123(1), 13-22.

Ortiz-Meoz, R. F., Jiang, J., Lazarus, M. B., Orman, M., Janetzko, J., Fan, C., ... & Walker, S. (2015). A small molecule that inhibits OGT activity in cells. ACS chemical biology, 10(6), 1392-1397.

Pedrosa, H. C., Braver, J. D., Rolim, L. C., Schmid, H., Calsolari, M., Fuente, G., & Odriozola, A. (2019). Neuropatía diabética. Revista Alad, 9, 72-91.

Fuentes-García, G., Patlán-Castañeda, C., Lefebvre, T., & Robles-Flores, M. (2021). La función de la O-β-N Acetilglucosamina (O-GLCNAC) en los procesos de enfermedad. Revista de Educación Bioquímica, 40(3), 128-144.

Zachara, N. E., Akimoto, Y., Boyce, M., & Hart, G. W. (2022). The O-GLCNAC modification. www.ncbi.nlm.nih.gov. https://doi.org/10.1101/glycobiology.4e.19

Chang, Y. H., Weng, C. L. y Lin, K. I. (2020). O-GlcNAcilación y su papel en el sistema inmunológico. Revista de ciencias biomédicas, 27(1), 57. https://doi.org/10.1186/s12929-020-00648-9

Naderer, T., Heng, J., & McConville, M. J. (2010). Evidence that intracellular stages of Leishmania major utilize amino sugars as a major carbon source. PLoS pathogens, 6(12), e1001245.

Chawla, B., & Madhubala, R. (2010). Drug targets in Leishmania. Journal of Parasitic Diseases, 34(1), 1–13. https://doi.org/10.1007/s12639-010-0006-3

Torres-Gutiérrez, E., Pérez-Cervera, Y., Camoin, L., Zenteno, E., Aquino-Gil, M. O., Lefebvre, T., Cabrera-Bravo, M., Reynoso-Ducoing, O., Bucio-Torres, M. I., & Salazar-Schettino, P. M. (2019). Identification of O-Glcnacylated Proteins in Trypanosoma cruzi. Frontiers in Endocrinology, 10. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00199

Abdelwahab, N. Z., Crossman, A. T., Sullivan, L., Ferguson, M. A., & Urbaniak, M. D. (2012). Inhibitors Incorporating Zinc-Binding Groups Target the GlcNAc-PI de-N-acetylase in Trypanosoma brucei, the Causative Agent of African Sleeping Sickness. Chemical biology & drug design, 79(3), 270-278.

Dhameliya, T. M., Chudasma, S. J., Patel, T. M., & Dave, B. P. (2022). A review on synthetic account of 1, 2, 4-oxadiazoles as anti-infective agents. Molecular Diversity, 26(5), 2967-2980.

Kayukova L.A. (2005). Drug synthesis methods and manufacturing technology: Synthesis of 1,2,4-oxadiazoles (a review). Pharmaceutical Chemistry Journal, 39(10), 32-40.

Somani, R. R., & Shirodkar, P. Y. (2011). Oxadiazole: A biologically important heterocycle. ChemInform, 42(10), no.

Mendes Rocha Yasmin, (2022). Evaluación in vitro de la actividad anti Trypanosoma cruzi de un derivado de 1,2,4-Oxadiazol. Universidad Federal de CEARÁ, Facultad de farmacia, odontología y enfermería, Trabajo de Tesis.

Rocha, Y. M. (2022). Avaliação in vitro da atividade anti Trypanosoma cruzi de um derivado de 1, 2, 4-oxadiazol.

Pitasse Santos, P.(2017). Planejamento, Síntese e Avaliação de Derivados 1,2,4-Oxadiazólicos com Potencial Atividade Tripanocida Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro. Tesis.

Pinheiro, C. V. G. (2024). Atividade anti-Leishmania spp in silico e in vitro de oxadiazóis sintéticos. Universidad Federal de CEARÁ, Facultad de farmacia, odontología y enfermería, Trabajo de Tesis.

Anexos

Reactivos para la electroforesis

Gel separador 10%	**10ml**	**20 ml**
Acrilamida/Bis 30%	3.3 ml	6.6ml
Tris-HCL 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	5 ml
SDS 10%	100 µl	200 µl
Agua desionizada	4.1 ml	8.2 ml
TEMED	5 µl	10 µl
APS 10%	50 µl	100 µl

Gel concentrador 4%	**15ml**
Acrilamida/Bis 30%	1.98 ml
Tris-HCL 0.5 M pH 6.8	3.78 ml
SDS 10%	150 µl
Agua desionizada	9 ml
TEMED	15 µl
APS 10%	75 µl

Tris-HCL 0.5 M pH 6.8	**100ml**
Tris-Base	6 g
Disolver en Agua inyectable	
Ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado	
Aforar a 100ml	
Guardar a 4°C	

Tris-HCL 1.5 M pH 6.8	**75ml**
Tris-Base	13.6 g
Disolver en Agua inyectable	
Ajustar pH a 8.8 con HCl concentrado	
Aforar a 75ml	
Guardar a 4°C	

TBST 10x pH 7.4	**1L**	**½ L**
150 mM Tris-Base	18.2 g	9.1 g
140 mM NaCl	81.2 g	40.6 g
0.05% Tween-20	5 ml	2.5 ml
Ajustar a pH 7.4 con HCl concentrado		
Aforar a	**1L**	**500 ml**

Buffer de corrida SDS-PAGE 1X	**1L**	**2L**
Tris-Base	3 g	6 g
Glicina	14.4 g	28.8 g
0.1% SDS	1 g	2g
Disolver con agua inyectable		
Consérvese a 4°C		
Aforar a	**1L**	**2 L**

Buffer de transferencia	**1L**	**2 L**
Tris-Base	3.03 g	6.06 g
Glicina	14.4 g	28.8 g
Metanol 20%	200 ml	400 ml
Disolver con agua inyectable		
Consérvese a 4°C		
Aforar a	**1L**	**2 L**

Solución de Stripping	**½ L**
Tris-Base pH6.8, 62mM	4.925 g
SDS 2%	10 g
B-mercaptoetanol	3.52 ml
Disolver con agua inyectable	
Aforar a	**500 ml**

Buffer de muestra	**2X**	**5X**
Agua	14.2 ml	5.68 ml
Tris 0.5 M pH 6.8	5 ml	5 ml
Glicerol	10 ml	10 ml
SDS 10%	8 ml	8 ml
Azul de bromofenol 0.5%	0.8 ml	0.8 ml

Se agrega β-mercaptoetanol, 50 µl por cada 950 µl de buffer de muestra, guardar a temperatura ambiente en oscuridad.

PBS	**10X**
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na_2HPO_4	14.4 g
KH_2PO_4	2.4 g

Ajustar el pH a 7.4

Aforar a 1L con agua inyectable

Tinción de Ponceau	**½ L**
Agua destilada	475 ml
Ácido acético glacial	25 ml
Rojo de Ponceau	0.5 g
Consérvese en un frasco ámbar	

Glosario

Abreviaturas

OMS: Organización mundial de la Salud

OPS: Organización panamericana de la Salud

HBP: Hexosamine Biosynthec Pathway

UTP: Uridina trifosfato

Ac-CoA: Acetil Coenzima A

O-GlcNAc: O-GlcNAcilación

UDP-GlcNAc: Uridina difosfato-N-acetilglucosamina

Ser: Serina

Thr: Treonina

GlcNAc: N-Acetilglucosamina

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

OGT: O-GlcNAc transferasa

OGA: O-GlcNAcasa

BCA: Ácido bicinconínico

CI50: Concentración inhibidora media

Términos

Leishmaniasis: es un conjunto de enfermedades zoonóticas y antroponóticas causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania*.

Vector: ser vivo que puede transmitir o propagar una enfermedad.

Flebotomínos: son insectos hematófagos reconocidos como vectores de distintas enfermedades, su mayor importancia medica es en la transmisión de *Leishmania spp.*

Protozoario: organismo unicelular eucariota, células que poseen núcleo definido y orgánulos.

Macrófagos: células especializadas capaces de fagocitar patógenos, forman parte del sistema inmune.

O-GlcNAcilación: es un tipo de glicosilación que se produce postraduccionalmente sobre un gran numero de proteínas nucleares y del citosol, consiste en la adición de N-Acetilglucosamina a un grupo hidroxilo de los aminoácidos serina o treonina en la cadena de polipéptidos.

Promastigote: es uno de los estadios que *Leishmania spp* presentan durante su ciclo de vida, tiene forma alargada y mide de 10 a 20 micras y posee un flagelo para desplazarse.

Amastigote: es otra de las formas que adoptan los parásitos del género *Leishmania spp.* durante su ciclo de vida, esta forma la adopta al ingresar dentro de la célula anfitrión, y es una forma no móvil, pero si replicativa.

Parasito: organismo vivo que vive a costa de otro organismo, alimentándose de él sin llegar a matarlo.

Anfitrión: organismo que alberga a otro en una relación de parasitismo.

Estadios: se refiere a las etapas de desarrollo de un organismo vivo, en este caso de los parásitos protozoarios.

Tripomastigote: es una forma extracelular no replicativa, pero si infectiva de los parásitos protozoarios *Tripanosoma cruzci*.

Postraduccional: hace referencia a la síntesis de proteínas, después de la traducción de ARNm a la cadena de polipéptidos que conforman una proteína.

Reticuloendotelial: constituye un sistema de células diversas y multifuncionales para con el sistema inmune y se encuentra distribuido por todo el cuerpo.

Epidemiologia: se refiere al estudio de la incidencia, distribución y control de la enfermedades en las poblaciones, investiga la enfermedad, su origen, factores de riesgo y modos de transmisión.

Nicho ecológico: se refiere a las condiciones ambientales y biológicas que una especie necesita para sobrevivir, como la humedad, temperatura y alimento.

Agente etiológico: microorganismo o factor ambiental que es causa de una enfermedad.

Epimastigote: es una forma extracelular y replicativa del *Tripanosoma cruzi*, presente en el intestino de los triatominos.

Morbilidad: frecuencia de aparición de una enfermedad en una población.

Mortalidad: tasa de muertes producidas en un lapso de tiempo por una enfermedad o causa determinada.