

**N-ÓXIDO DE HETEROCICLOS  
AROMÁTICOS CON ACTIVIDAD SOBRE  
*TRYPANOSOMA CRUZI*:  
APROXIMACIÓN AL TIPO DE MUERTE  
CELULAR Y MECANISMO DE ACCIÓN**

**TESIS DE MAESTRÍA EN QUÍMICA**

Bioquímico Clínico Diego Benítez

Directores de Tesis:

Dra. Mercedes González, Dr. Hugo Cerecetto  
Directora académica: Dra. Mercedes González

**Grupo de Química Medicinal,  
Laboratorio Química Orgánica, Facultad de  
Química-Facultad de Ciencias  
Universidad de la República  
Montevideo, Uruguay  
Abril, 2011**

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	I
<b>ABREVIATURAS</b>	III
<b>RESUMEN</b>	V
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Muerte celular	2
1.2.1. Apoptosis	2
1.2.1.1. Fase de decisión	4
1.2.1.2. Fase de compromiso	5
1.2.1.3. Fase de ejecución	6
1.2.1.4. Apoptosis en protozoarios	8
1.2.1.5. Métodos para estudio de apoptosis	8
1.2.2. Autofagia	9
1.2.2.1. Autofagia como estrategia terapéutica	10
1.2.2.2. Métodos para estudio de autofagia	10
1.2.3. Necrosis	10
1.2.3.1. Métodos para estudio de necrosis	10
1.2.3.2. Necrosis programada	11
1.3. Uso de RMN para estudios del tipo de muerte celular	11
1.4. Metabolismo energético de los tripanosomatídeos	14
<b>2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b>	19
2.1. I+D de nuevos fármacos antichagásicos	19
2.2. Objetivos generales	21
2.3. Objetivos específicos	21
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	22
3.1. Consideraciones generales	22
3.2. Estudio del tipo de muerte celular	23
3.2.1. Ensayo de microscopia óptica	23
3.2.2. Ensayo de TUNEL y tinción con IP	23
3.2.3. Ensayo de hemólisis	23
3.2.4. Identificación del tipo de muerte celular en <i>T. cruzi</i> por <sup>1</sup> H-RMN	24
3.2.4.1. Induciendo apoptosis con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	24
3.2.4.2. Induciendo apoptosis en la fase estacionaria de crecimiento	24
3.2.4.3. Induciendo necrosis por Nfx y Qdo2	25
3.2.5. Análisis ultraestructural (MET)	25
3.2.6. Estudios con inhibidor del proceso de autofagia: 3-MA	26
3.3. Estudio del mecanismo de acción	26
3.3.1. Determinación del cambio metabólico en <i>T. cruzi</i> utilizando <sup>1</sup> H-RMN	26
3.3.2. Determinación de la actividad inhibitoria de enzimas deshidrogenasas mitocondriales	27

<b>4. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA</b>	28
<b>5. ESTUDIOS DEL TIPO DE MUERTE</b>	30
5.1. Estudios de microscopia óptica como aproximación al análisis del tipo de muerte del parásito tratado con los compuestos en estudio	30
5.2. Confirmación del tipo de muerte celular por las técnicas de TUNEL y tinción con IP	36
5.3. Estudio de la interacción de los compuestos con la membrana del eritrocito	40
5.4. Identificación del tipo de muerte celular en <i>T. cruzi</i> por <sup>1</sup> H-RMN	41
5.4.1. <i>Induciendo apoptosis con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	43
5.4.2. <i>Induciendo apoptosis por envejecimiento del cultivo de parásitos en medio axénico</i>	46
5.4.3. <i>Induciendo necrosis por Nfx y Qdo2</i>	48
5.5. Análisis ultraestructural (MET)	50
5.6. Estudios con inhibidor del proceso de autofagia: 3-MA	56
<b>6. ESTUDIOS DEL MECANISMO DE ACCIÓN</b>	57
6.1. Determinación del cambio metabólico en <i>T. cruzi</i> por <sup>1</sup> H-RMN	57
6.2. Determinación de la actividad inhibitoria de enzimas deshidrogenasas mitocondriales	66
<b>7. CONCLUSIONES</b>	68
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	69

## ABREVIATURAS

1,3BPGA	<i>Acrónimo inglés de 1,3-bisphosphoglycerate</i>
2Ket	<i>Acrónimo inglés de 2-ketoglutarate</i>
3-MA	3-Metiladenina
3-PGA	<i>Acrónimo inglés de 3-phosphoglycerate</i>
AA	<i>Acrónimo inglés de Amino acid</i>
Ace	Acetato
AIF	<i>Acrónimo inglés de Apoptosis-inducing factor</i>
Ala	Alanina
ANT	<i>Acrónimo inglés de ADP-ATP translocase</i>
AOB	<i>Acrónimo inglés de Amino oxobutyrate</i>
APAF1	<i>Acrónimo inglés de Apoptotic protease-activating factor-1</i>
ARNi	ARN de interferencia
AT	Azul de tripan
ATGs	<i>Acrónimo inglés de Autophagy related genes</i>
BAK	<i>Acrónimo inglés de BCL2-antagonist/killer-1</i>
BAX	<i>Acrónimo inglés de BCL2-associated X protein</i>
BCL2	<i>Acrónimo inglés de B-cell lymphoma protein 2</i>
BID	<i>Acrónimo inglés de BH3 Interacting domain death agonist</i>
BIK	<i>Acrónimo inglés de BCL2-interacting killer</i>
Bnz	Benznidazol
CAD	<i>Acrónimo inglés de Caspase-activated deoxyribonuclease</i>
CARD	<i>Acrónimo inglés de Caspase recruitment domain</i>
CE	<i>Acrónimo inglés de Cholesteryl esters</i>
Cit	<i>Acrónimo inglés de Citrate</i>
CoASH ó CoA	<i>Acrónimo inglés de Coenzyme A</i>
DAPI	<i>Acrónimo inglés de 4',6-diamidino-2-fenilindol</i>
dATP	<i>Acrónimo inglés de Deoxyadenosinetriphosphate</i>
DE	Desviación estandar
DED	<i>Acrónimo inglés de Death-effector domain</i>
DFF	<i>Acrónimo inglés de DNA Fragmentation Factor</i>
DG	<i>Acrónimo inglés de Diacylglycerides</i>
DHAP	<i>Acrónimo inglés de Dihydroxyacetone phosphate</i>
DISCs	<i>Acrónimo inglés de Death-induced signalling complexes</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DR	<i>Acrónimo inglés de Death receptor</i>
EtOH	Etanol
F-6-P	<i>Acrónimo inglés de Fructose 6-phosphate</i>
FADD	<i>Acrónimo inglés de FAS-associating death domain-containing protein</i>
FBP	<i>Acrónimo inglés de Fructose 1,6-bisphosphate</i>
FID	<i>Acrónimo inglés de Free induction decay</i>
FT	<i>Acrónimo inglés de Fourier transform</i>
G-3-P	<i>Acrónimo inglés de Glyceraldehyde 3-phosphate</i>
G-6-P	<i>Acrónimo inglés de Glucose 6-phosphate</i>
GLU	<i>Acrónimo inglés de Glutamate</i>
Gly	Glicina
Gly-3-P	<i>Acrónimo inglés de Glycerol 3-phosphate</i>
γSAG	<i>Acrónimo inglés de Glutamate γ-semialdehyde</i>

HSP	<i>Acrónimo inglés de Heat shock protein</i>
HtrA2	<i>Acrónimo inglés de High temperature requirement A2</i>
IAPs	<i>Acrónimo inglés de Inhibitor of apoptosis proteins</i>
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
ICAD	<i>Acrónimo inglés de Inhibitor of CAD</i>
IP	Ioduro de propidio
IS	Índice de selectividad
IsoCit	<i>Acrónimo inglés de Isocitrate</i>
Lac	Lactato
MDM2	<i>Acrónimo inglés de Murine doble minute 2</i>
MET	Microscopia electrónica de transmisión
ML	<i>Acrónimo inglés de Mobile lipids</i>
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
Nfx	Nifurtimox
NF-κB	<i>Acrónimo inglés de Nuclear factor-κB</i>
OA	<i>Acrónimo inglés de 2-oxoacid</i>
Oxac	<i>Acrónimo inglés de Oxaloacetate</i>
PARP	<i>Acrónimo inglés de Poly (ADP) ribose polymerase</i>
PBS	<i>Acrónimo inglés de Phosphate buffered saline</i>
PC	<i>Acrónimo inglés de Phosphatidylcoline</i>
PCD	<i>Acrónimo inglés de Programmed cell death</i>
PE	<i>Acrónimo inglés de Phosphatidylethanolamine</i>
PEP	<i>Acrónimo inglés de Phosphoenolpyruvate</i>
PERP	<i>Acrónimo inglés de p53 apoptosis effector related to PMP-22</i>
Pi	<i>Acrónimo inglés de Inorganic phosphate</i>
PI3K	<i>Acrónimo inglés de Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PL	<i>Acrónimo inglés de Phospholipids</i>
PMP-22	<i>Acrónimo inglés de Peripheral myelin protein 22</i>
PPi	<i>Acrónimo inglés de Inorganic pyrophosphate</i>
PS	<i>Acrónimo inglés de Phosphatidylserine</i>
Pyr	Piruvato
Qdo	Di- <i>N</i> -óxido de quinoxalina
RIP1	<i>Acrónimo inglés de Receptor-interacting protein-1</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
RT-PCR	<i>Acrónimo inglés de Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>Acrónimo inglés de Sodium dodecylsulfate</i>
Smac/Diablo	<i>Acrónimo inglés de second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI</i>
Succ	Succinato
SucCoA	<i>Acrónimo inglés de Succinyl-CoA</i>
T[SH] <sub>2</sub>	Forma reducida de la tripanotona
TCA	<i>Acrónimo inglés de Tricarboxylic acid</i>
TdT	<i>Acrónimo inglés de Terminal deocyttransferase</i>
TG	Triacilglicéridos
TNFR	<i>Acrónimo inglés de Tumour-necrosis factor receptor</i>
TRADD	<i>Acrónimo inglés de TNF receptor type 1-associated death domain protein</i>
TUNEL	<i>Acrónimo inglés de Terminal deocyttransferase-mediated dUTP nick-end labeling</i>
UQ	<i>Acrónimo inglés de Ubiquinone pool</i>

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una zoonosis cuyo agente etiológico es un protozoo flagelado, el *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae). A más de un siglo de su descubrimiento, esta patología compromete la salud de un gran número de habitantes en Latinoamérica, no existiendo hasta el momento fármacos completamente efectivos para su tratamiento.

De la quimioteca de agentes anti-*T. cruzi* de nuestro laboratorio se seleccionaron compuestos pertenecientes a tres diferentes familias de *N*-óxido de heterociclo-aromático (tres furoxanos, Fx1, Fx2 y Fx3, dos benzofuroxanos, Bfx1 y Bfx2, y dos di-*N*-óxido de quinoxalinas, Qdo1, Qdo2), además de un nitrofurano (Nf1). Estos productos, son el resultado de optimizaciones químicas dirigidas por la actividad observada. Se escoge además como fármaco de referencia a Nifurtimox, como forma de comparar el comportamiento biológico de *T. cruzi* frente a los compuestos objeto de este estudio.

Trabajando sobre epimastigotes de *T. cruzi* se realizaron estudios que demostraron o aproximaron al tipo de muerte celular que el parásito expuesto a cada uno de los compuestos estudiados.

Primariamente fueron realizados estudios de microscopía óptica-tinción con azul de tripan o microscopía fluorescente-tinción con yoduro de propidio. De estos estudios, se determinó que todos los compuestos a dosis altas, excepto el furoxano Fx1 que por su baja actividad y baja solubilidad no permite extraer conclusiones, promueven una pérdida de la integridad de membrana de *T. cruzi* que indicarían una muerte por necrosis. Los estudios de muerte celular a bajas dosis, por ensayo de TUNEL, no evidencian muerte de *T. cruzi* por apoptosis con ninguno de los compuestos estudiados.

Particularmente, el nitrofurano Nf1, el furoxano Fx3 y el benzofuroxano Bfx1 inducen en el parásito, previo a su muerte y manteniendo adecuada movilidad, la formación de estructuras citoplasmáticas vacuolares que podrían indicar muerte por autofagia. Para concluir respecto a este punto se realizaron estudios morfológicos por microscopía electrónica de transmisión y experimentos con el inhibidor de autofagia 3-Metiladenina. Estos estudios no son concluyentes, sin embargo las microfotografías del tratamiento con estos 3 compuestos identifican estructuras tipo-autofagosoma.

Se implementa el uso de  $^1\text{H}$ -RMN para determinar el tipo de muerte celular en epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y cuantificando las señales correspondientes a metilenos y metilos de los lípidos móviles de las membranas, estudiando además las modificaciones de fosfatidilcolina.

Esta es la primera vez que se utiliza dicha técnica para estudios con parásitos y especialmente con *T. cruzi*.

Por otro lado, se estudió el cambio en el perfil metabólico de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con los compuestos de este estudio. Para ello se utilizó la medida, por  $^1\text{H}$ -RMN, de los metabolitos excretados por el parásito. De acuerdo a estos resultados se decidió identificar un grupo de enzimas que podrían estar involucradas en el mecanismo de acción de los agentes. Por ello, se analizó la inhibición de deshidrogenasas mitocondriales, por ensayo con MTT a tiempos cortos. Estos estudios permiten plantear un posible mecanismo de acción común para los di-*N*-óxido de quinoxalinas Qdo1 y Qdo2 por inhibición de la fumarato reductasa o la malato deshidrogenasa mitocondriales o ambas.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Generalidades

La enfermedad de Chagas constituye un grave problema de salud para América Latina, presentándose en 21 países del continente. Esta enfermedad se asocia a poblaciones rurales y suburbanas más pobres, quienes por habitar en viviendas precarias se encuentran expuestos al vector biológico.

*T. cruzi* es un parásito heteroxeno, cuyo ciclo de vida involucra un insecto vector, la vinchuca (orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae o triatomínios) y huéspedes mamíferos, pudiendo ser este último el hombre. La colonización de diversos huéspedes requiere de profundos cambios metabólicos y morfológicos. El ciclo de vida del parásito involucra 3 estadios principales (Fig. 1) [1a]. En el intestino de la vinchuca habitan y se multiplican los epimastigotes, los cuales a medida que avanzan por el intestino se diferencian en tripomastigotes metacíclicos. Estos últimos pueden infectar el huésped mamífero, invadir células y transformarse en amastigotes. Los amastigotes se multiplican en el interior de las células hasta que las hacen estallar y se liberan al torrente circulatorio como tripomastigotes.

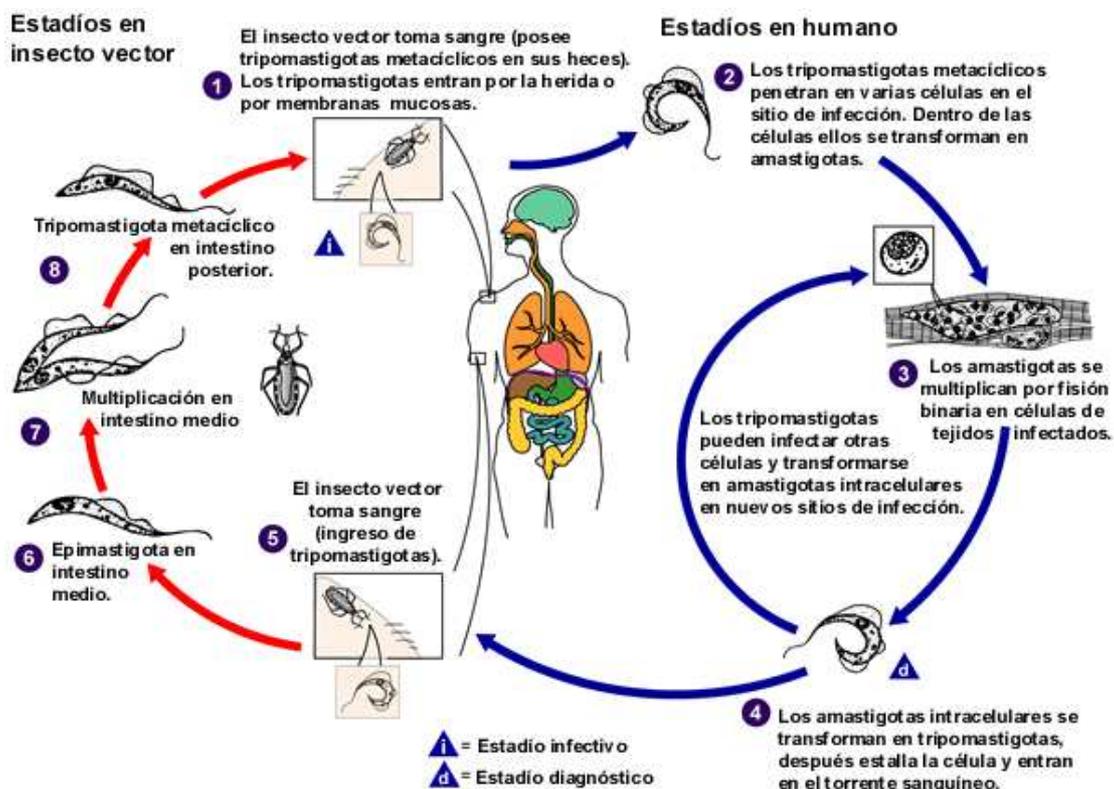


Fig. 1. (extraída de la referencia [1a] y traducido al español): Ciclo de vida de *T. cruzi*.

En el Uruguay se logró la interrupción vectorial de la enfermedad en 1997, sin embargo son necesarias medidas de control y vigilancia permanente tanto del vector domiciliario *Triatoma infestans* como de Triatomíneos silvestres que continúan siendo reservorios del parásito y comienzan procesos de domiciliación.

No obstante los avances recientes en el control de la transmisión vectorial, transfusional y congénita, se estima que aproximadamente 8 millones de personas se encuentran infectadas [1b,c]. La enfermedad comienza usualmente como una infección aguda seguida



de apoptosis, porque mutantes carentes de este gen determinaba muerte del nematodo durante el desarrollo por muerte masiva de células). El descubrimiento de estos genes fue motivo del Premio Nobel en Fisiología o Medicina para los científicos Sydney Brenner, John E. Sulston y H. Robert Horvitz, en el año 2002.

Como se puede observar en la Fig. 3, la maquinaria básica de muerte celular por apoptosis por la vía intrínseca está altamente conservada en la evolución de los metazoos [7]:

\* CED-3 es una cisteína proteasa con una función similar a la caspasa-3.

\* CED-4 es una proteína adaptadora (APAF1) que desencadenaría la activación de CED-3 si no estuviera unida a CED-9.

\* CED-9 es una proteína supresora de muerte celular (homóloga a las proteínas antiapoptóticas de la familia BCL2).

\* EGL-1 es una proteína proapoptótica homóloga a los miembros del grupo III de la familia BCL2. Desplaza a CED-9 de CED-4.

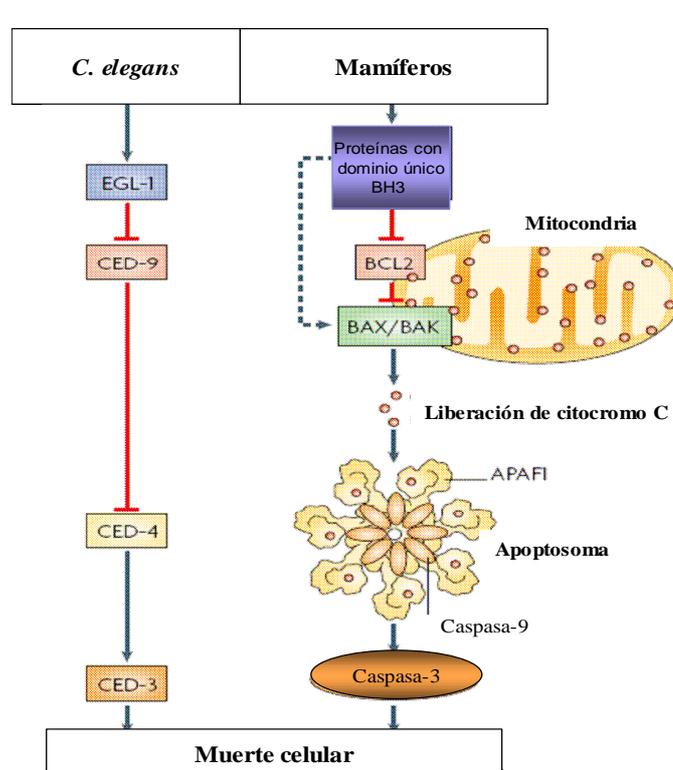


Fig. 3. (extraída de la referencia [7] y traducida al español): La maquinaria básica de muerte celular por apoptosis por la vía intrínseca se conserva en la evolución de los metazoos, pero el sistema de apoptosis en mamíferos evidencia un proceso más complejo en el cual las 4 proteínas de *C. elegans* se han expandido a familias de múltiples proteínas que cumplen las mismas funciones.

El proceso apoptótico juega un rol muy importante en los organismos pluricelulares durante el desarrollo (morfogénesis, diferenciación sexual, formación y maduración del sistema nervioso y del sistema inmune), en el mantenimiento de la homeostasis tisular en el adulto, eliminando células dañadas o anómalas en la defensa contra infecciones y en la regulación del proceso fisiológico de envejecimiento. Aunque este proceso de muerte fue descrito por primera vez en 1972 [8], en los últimos años ha recibido más atención debido a su rol en la eliminación de células tumorales y por defecto en la carcinogénesis.

La regulación de la apoptosis se produce a varios niveles que se dividen en 3 fases: fase de decisión, fase de compromiso y fase de ejecución.

### 1.2.1.1. Fase de decisión

La célula toma la "decisión" de entrar en apoptosis. Recibe señales pro y antiapoptóticas tanto externas como internas. Estas señales internas son proteínas codificadas por genes, entre los que se encuentran algunos genes que regulan el ciclo celular, genes de la familia BCL2 y las citoquinas de supervivencia.

#### *Genes que regulan el ciclo celular*

Genes implicados en el proceso de proliferación tienen un doble papel al participar también en la PCD. Este doble papel, se interpreta como un doble control celular, si las células escapan al control del ciclo celular, como ocurre con las células cancerígenas, el organismo decide deshacerse de ellas. Dentro de este grupo de genes se puede destacar a *p53*, *C-MYC*, *E2F*, *NF- $\kappa$ B*. El gen supresor de tumores *p53* es un factor de transcripción que se activa en respuesta a un daño del ADN o mediante estímulos de estrés celular. Su activación da lugar a una parada del ciclo celular (en G1 o G2 o ambos) y a un proceso de senescencia o apoptosis. La acción apoptótica de *p53* se ejerce a nivel mitocondrial donde puede interactuar directamente con BCL2 y BCL-XL, liberando moléculas proapoptóticas como BAK y BAX que se hayan unidas a BCL2 y BCL-XL, y por lo tanto quedarían libres para inducir los cambios mitocondriales que llevarían a la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria. Un exceso de BCL2 y BCL-XL, inhibiría la liberación del citocromo-c de la mitocondria inducida por *p53*. La proteína *p53* como factor de transcripción en la apoptosis actuaría a varios niveles y en 2 rutas diferentes, una extrínseca y otra intrínseca (Fig.4). En la ruta extrínseca están implicados los receptores de muerte, perteneciente a la familia TNFR, los cuales mediante transducción de señales llevan a la activación de caspasas, especialmente caspasa-8 y caspasa-3. La proteína *p53* puede activar esta ruta induciendo la expresión de 3 proteínas transmembrana: FAS, DR5 y PERP. La ruta intrínseca implica a la mitocondria que produce la liberación de factores proapoptóticos, siendo *p53* responsable de la inducción directa de los genes proapoptóticos de la familia BCL2 (BAX, NOXA, PUMA, BID). Además *p53* activa la expresión de APAF1, que junto al citocromo-c, proveniente de la liberación de la mitocondria, son los iniciadores para la formación del apoptosoma. La conexión de la ruta extrínseca con la intrínseca también la realiza *p53*, mediante la regulación transcripcional de BID. Este miembro proapoptótico de la familia BCL2 es activado por caspasa-8, la cual se activa por la ruta extrínseca y una vez activado BID es capaz de trasladarse a la mitocondria y activar a BAK, activando la ruta intrínseca [9].

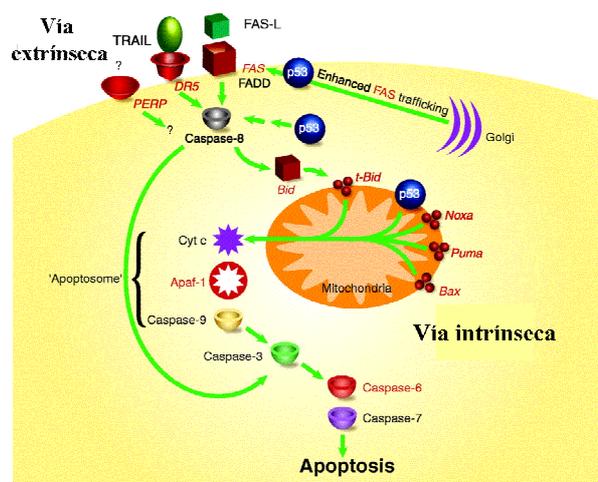


Fig. 4. (extraída de la referencia [9] y traducida al español): Vía extrínseca y Vía intrínseca mediada por *p53*.

### Genes de la familia BCL2

Estos genes implican miembros antiapoptóticos y proapoptóticos. Se encuentran localizados en la membrana externa mitocondrial, RE y membrana nuclear. Cada miembro de la familia BCL2 contiene 4 dominios de homología llamados BH1, BH2, BH3 y BH4. Según estos la familia se divide en tres grupos (Fig. 5):

I) Compuesto por miembros antiapoptóticos, poseen los 4 dominios de homología (BCL2, BCL-XL, MCL1).

II) Compuesto por miembros proapoptóticos, tienen el dominio BH1, 2 y 3, pero no el BH4 (BAX y BAK).

III) Compuesto por miembros proapoptóticos, con dominio único BH3 (BID, BIK, BIM, BAD, NOXA, PUMA).

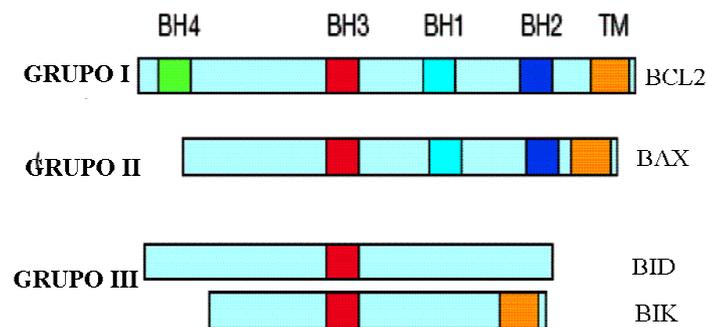


Fig. 5. (extraída de la referencia [9] y traducida al español): Grupos de la Familia BCL2 y ejemplos de proteínas de estos grupos.

El dominio BH3 es esencial para la heterodimerización de los miembros de la familia, la heterodimerización ocurre por inserción del dominio BH3 dentro del bolsillo hidrofóbico compuesto por BH1, BH2, BH3 de las proteínas antiapoptóticas. Los miembros proapoptóticos pueden heterodimerizar con los antiapoptóticos y bloquear su acción antiapoptótica. La relación en los niveles de expresión entre antiapoptóticos/ proapoptóticos determinan si la célula va a sufrir apoptosis o no tras un estímulo apoptótico. Por ejemplo, cuando BCL2 está en exceso, la célula está protegida de la muerte, sin embargo cuando BAX está en exceso la célula está avocada a entrar en apoptosis.

### Receptores de muerte celular

Los mismos se encuentran involucrados en la ruta extrínseca. Pertenecen a la superfamilia del TNFR tales como: FAS (CD95), TNFR1 y receptores de muerte tales como DR4 y DR5. La unión de estos a sus ligandos provoca la agregación del receptor y el reclutamiento de proteínas adaptadoras, que mediante la interacción proteína-proteína van a constituir complejos intracelulares de proteínas (DISCs) capaces de transmitir la señal de muerte hasta las moléculas efectoras, las caspasas, por ejemplo caspasa-8 (Fig. 6). A su vez caspasa-8 puede activar caspasa-3 y -7.

#### 1.2.1.2. Fase de compromiso

En esta fase la mitocondria juega un rol muy importante porque en ella convergen las distintas rutas apoptóticas, aunque hay que destacar que no todas las rutas apoptóticas pasan por la mitocondria como es el caso de la apoptosis inducida por FAS [7, 9].

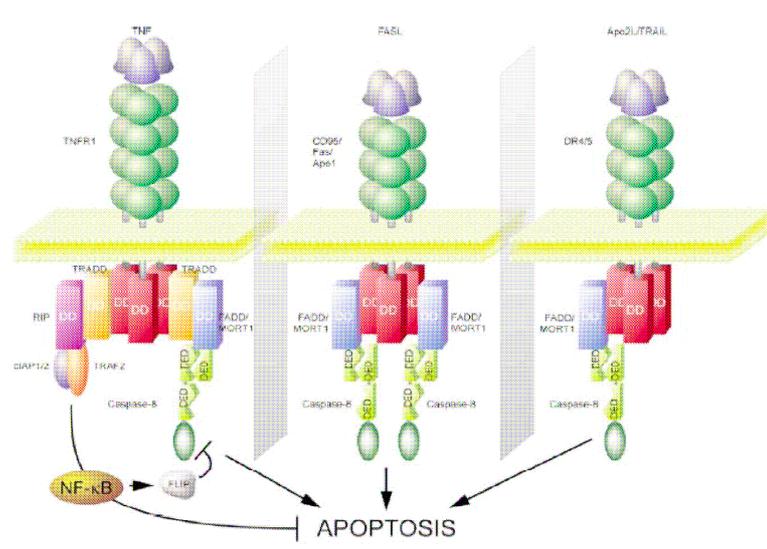


Fig. 6. (extraída de la referencia [7]):  
Receptores de muerte y DISCs.

Entre los factores más importantes que regulan esta fase están todos los factores apoptogénicos que se liberan desde la mitocondria:

- Citocromo c que participa en la activación de caspasas a través de la formación del apoptosoma.
- HSP10 y HSP60 las cuales facilitan la activación de la caspasa-3.
- AIF, flavoproteína que al liberarse de la mitocondria se transloca al núcleo donde provoca la condensación y ruptura del ADN en fragmentos de alto peso molecular (50KB). Además, a nivel de membrana activa a la flipasa e inhibe a la translocasa, por lo que los restos de PS que en células normales se encuentran en la cara interna de la membrana se exponen al exterior. La actividad de AIF es inhibida por la sobreexpresión de BCL2, pero no por los inhibidores de caspasas.
- Smac/diablo, inhibidor de las IAPs las cuales tiene la habilidad de inhibir a las caspasas activas, por lo tanto, previene la inactivación de las caspasas.
- HtrA2, serina proteasa inhibidor de IAPs.
- Endonucleasa G, tras su liberación se trasloca al núcleo y está involucrada en la fragmentación del ADN junto con exonucleasas y la ADNasaI, produciendo posiblemente el típico patrón en “escalera del ADN”. Esta acción es caspasa independiente.

El hecho de que todos estos factores apoptóticos estén confinados en la mitocondria y que sus sustratos estén en el citoplasma supone una garantía de que sólo van a ejercer su acción mortal si son liberados durante el proceso apoptótico. Particularmente el citocromo c juega un rol muy importante en la activación de caspasas vía la formación del apoptosoma. Este se forma tras la unión del citocromo c, APAF 1, caspasa-9 y dATP. El apoptosoma en su forma activa es capaz de activar a caspasa-3 y a caspasa-7.

### 1.2.1.3. Fase de ejecución

Es la fase en la cual todos los cambios morfológicos se hacen evidentes. Los mediadores son las caspasas.

#### Caspasas

Son cisteína proteasas que únicamente cortan después de un residuo de aspártico y tienen un sitio activo muy conservado. En mamífero se conocen 14 tipos de caspasas que se pueden dividir en caspasas iniciadoras y efectoras. Las iniciadoras son las primeras

en activarse y activan las efectoras. Las más importantes son la caspasa-9, como caspasa iniciadora y la caspasa-3, como caspasa efectora. Se sintetizan como zimógenos. Constan de un pre-dominio *N*-terminal, una subunidad larga (p20) y otra pequeña (p10). La activación implica un corte entre la subunidad larga y pequeña y la eliminación del pre-dominio. Según el predominio se clasifican en 2 grupos; caspasas efectoras, las cuales no tiene predominio o lo tienen muy corto como caspasa-3, -6, -7 y -14. Las caspasas iniciadoras poseen un predominio largo como caspasa-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -12 y -13.

#### *Los mecanismos de activación de caspasas*

a) Activación por otra caspasa o transactivación: es el mecanismo de activación de las caspasas efectoras e implica la activación de una caspasa por otra previamente activada. Se produce de forma secuencial determinando la cascada de caspasas. Las caspasas efectoras amplifican la señal y ejecutan la muerte celular cortando proteínas reguladoras y estructurales lo que conlleva al colapso de la célula.

b) Activación inducida por proximidad: es el caso de receptores que trimerizan, reclutan caspasas y se procesan mutuamente. Es el mecanismo de activación de las caspasas iniciadoras y es el que desencadena la vía extrínseca (CD95).

c) Activación por asociación con una subunidad reguladora (cofactor u adaptador): no se activan por proteólisis sino por un cambio conformacional. Es el mecanismo de activación de caspasas iniciadoras. Es el caso del apoptosoma (caspasa-9; cofactor: APAF1; citocromo c), involucrado en vía intrínseca o mitocondrial.

#### *Acciones de las caspasas*

Implica activación o inactivación de sus sustratos. Se destacan:

- inactivación de proteínas del citoesqueleto (por ej. laminina, actina, gelsolina, vimentina).
- proteínas asociadas al ADN como PARP, DFF, ICAD (inactivación del complejo ICAD/DFF45 mediada por caspasa-3 permite a la proteína CAD entrar en el núcleo y fragmentar el ADN, originando la característica “escalera de ADN”).
- activación por proteólisis de BID, que activado por caspasa-8, se trasloca a la mitocondria para cooperar con BAX y BAK provocando la liberación de moléculas apoptóticas mitocondriales.
- caspasa-3 es capaz de cortar a BCL2, quitando su dominio BH4, lo que la convierte en una molécula con actividad proapoptótica, más que antiapoptótica.
- inactivación de NF- $\kappa$ B mediante el corte en la zona de regulación de su inhibidor I $\kappa$ B y también por corte directo de p65.
- estabilización de p53 por corte de su inhibidor MDM2.

#### *Inhibición de las caspasas*

a) inactivación por interacción con proteínas (los IAPs).

b) inactivación por modificación proteica:

- por fosforilación, por ejemplo AKT, la cual es una quinasa serina/treonina de supervivencia y mediador de PI3K, que puede fosforilar el centro activo de caspasa-9 inhibiendo su función.
- por nitrosilación, el óxido nítrico forma complejo con las caspasas quedando estas S-nitrosiladas y reversiblemente inactivadas.

c) otros procesos:

- BCL2 y BCL-XL: evitan la liberación del citocromo c y por lo tanto la formación del apoptosoma.
- BCL-XL: puede unirse a APAF1 impidiendo la asociación entre APAF1 y caspasa-9.

#### 1.2.1.4. Apoptosis en protozoarios

Aunque las características de apoptosis están ausentes en muchos organismos unicelulares, ha surgido evidencia de PCD en cianobacterias, levadura y varios protozoarios, incluyendo tripanosomatídeos. En nematodos (*C. elegans*) la maquinaria enzimática es más simple que en vertebrados, aunque mantiene la homología funcional de las proteínas involucradas [10-13], por lo que los mecanismos bioquímicos que conducen a apoptosis dependen del linaje celular y del estímulo de muerte [14]. Por esta razón en muchas publicaciones se prefiere hablar de muerte tipo-apoptótica para diferenciarla de la muerte apoptótica que sufren las células de metazoarios.

En organismos no metazoarios (protozoarios, plantas y hongos) se habla de metacaspasas, enzimas homólogas a las caspasas [15] para hacer referencia a procesos asociados con apoptosis. En protozoarios se piensa que la PCD puede jugar un rol en la regulación del número de parásitos en los tejidos del vector biológico y en los hospederos definitivos, como mecanismo de inmunomodulación y en la diferenciación del parásito [11].

Ameisen, J.C. y colaboradores en 1995 demuestran que en respuesta a diferentes estímulos extracelulares, epimastigotes de *T. cruzi* mueren por PCD con características de apoptosis [10]. Así por ejemplo, el suero humano fresco ha sido usado como inductor de apoptosis [12], en tanto  $H_2O_2$  ha sido descrito como agente inductor de apoptosis en promastigotes de *Leishmania donovani* [16].

#### 1.2.1.5. Métodos para estudio de apoptosis

La apoptosis se acompaña de una transformación en forma de pelota de la célula, reducción del volumen celular, externalización de fosfatidilserina (PS *acrónimo del inglés*), condensación de la cromatina, fragmentación del ADN nuclear en fragmentos oligonucleosomales, burbujas de membrana plasmática y mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática hasta que el proceso haya finalizado. Por último, como resultado de grandes invaginaciones que sufre la célula, ocurre la formación de cuerpos apoptóticos [8].

Algunos métodos que se emplean para el estudio de apoptosis incluyen:

- a) microscopía (óptica, de fluorescencia, de transmisión): para la detección de características morfológicas clásicas de las células apoptóticas [8,11], como son los núcleos picnóticos, cuerpos apoptóticos,
- b) ensayo de TUNEL: para la detección de extremos 3'-OH libres del ADN,
- c) extracción de ADN y electroforesis en gel de agarosa [11]: para la detección de “escalera de ADN”, intervalos múltiples de 180 pb generados por cortes internucleosomales,
- d) citometría de flujo: medición de la externalización de PS en la membrana plasmática con anexina V marcada con fluorescencia [11],
- e) reacción colorimétrica: para la determinación de la actividad de caspasa-3, empleando un sustrato e inhibidor [11],
- f) Western Blot: para evaluar la liberación de citocromo c al citosol [12],
- g)  $^1H$ -RMN: para cuantificar el aumento de los ML utilizando el cociente de las señales metileno/metilo ( $CH_2/CH_3$ ) proveniente de estos [17].

De todas las técnicas anteriormente mencionadas la única que nunca se ha empleado en la identificación del tipo de muerte celular en *T. cruzi* ha sido la  $^1H$ -RMN.

### 1.2.2. Autofagia

Es el mayor proceso empleado por células eucariotas para degradar y reciclar sus proteínas y organelos. Porciones del citoplasma son rodeadas por vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas (Fig. 7, página siguiente) [18] los cuales subsecuentemente se fusionan con los lisosomas permitiendo de esta manera la degradación del material por hidrolasas lisosomales.

En *Saccharomyces cerevisiae* fueron identificados 16 genes esenciales relacionados con el proceso de autofagia (*ATGs*). Entre estos genes, 2 sistemas tipo-ubiquitina juegan un importante rol en las tempranas etapas de la biogénesis de autofagosomas. El primero es el sistema ATG12, donde la proteína tipo-ubiquitina ATG12 es conjugada a la proteína ATG5 en un proceso mediado por ATG7, una enzima tipo-E1<sup>6</sup> (enzima activante de ubiquitina) y ATG10, una enzima tipo-E2 (enzima conjugante de ubiquitina). El conjugado ATG12-ATG5 forma un complejo con la proteína ATG16 que se piensa conduce a la formación de una vesícula. El segundo sistema es el ATG8, en este participa ATG8, una proteína tipo-ubiquitina que actúa en la expansión y conclusión de la vesícula. Esta proteína es degradada por la proteasa ATG4 (autofagina), que expone entonces un residuo de Gly, el cual se une covalentemente a fosfatidiletanolamina (PE, *Acrónimo inglés de Phosphatidylethanolamine*) por la acción concertada de las proteínas ATG7 y ATG3, esta última es una enzima conjugante específica tipo-E2. Esto le permite a la proteína ATG8 asociarse fuertemente con las membranas. Antes de la fusión con el lisosoma, ATG8 es desconjugada de la PE en la membrana externa por ATG4 y liberada al citosol para ser reutilizada en la formación de una nueva vesícula.

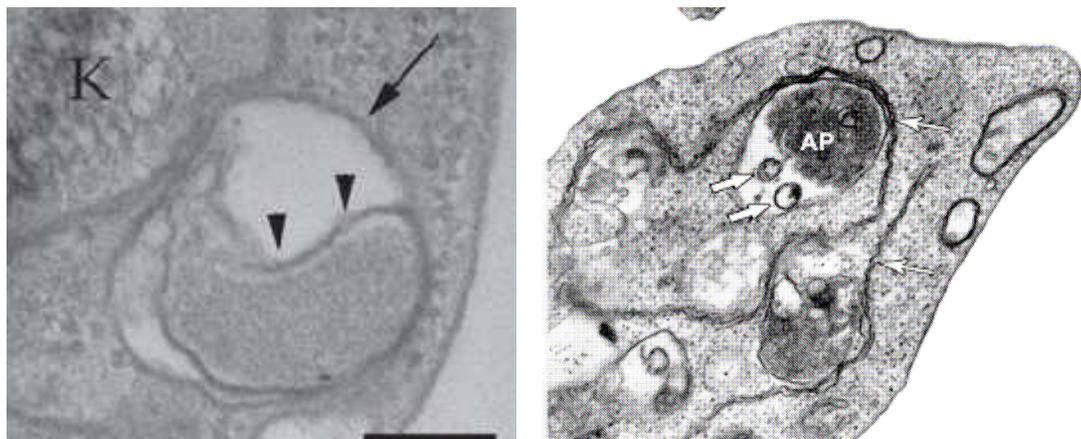


Fig. 7. (extraído de las referencias [19] y [20a]): *Epimastigotes* de *T. cruzi* tratados con PBS (izquierda) o un naftoimidazol (derecha) mostrando la presencia de cuerpos multivesiculares y estructuras tipo-autofagosoma. Izquierda: autofagosoma, flecha fina, membrana externa; cabezas de flechas, membrana interna del mismo; K, cinetoplasto. Derecha: AP, autofagosoma; flecha fina, retículo endoplásmico, flechas gruesas, vesículas dentro del AP.

El genoma de *T. cruzi* contiene la mayoría de los genes del sistema ATG8 (*ATG3*, *ATG4*, *ATG7*, *ATG8*), mientras que le faltan la mayoría de los componentes del sistema ATG12 (*ATG12*, *ATG5*, *ATG10*). En contraste con las levaduras, 2 homólogos de ATG4 (*TcATG4.1* y *TcATG4.2*) y 2 de ATG8 (*TcATG8.1* y *TcATG8.2*) fueron encontradas en *T. cruzi*. La actividad autofagica se expresa en todos los estadios del parásito y se potencia en el proceso de diferenciación de un estadio a otro [18b].

### *1.2.2.1. Autofagia como estrategia terapéutica*

Existen dos enfoques diferentes del uso del proceso de autofagia como estrategia terapéutica para luchar contra las infecciones de este parásito. Uno de ellos dice que conviene bloquear el proceso de autofagia, para de esa manera evitar la diferenciación del parásito en sus diferentes estadios y por este motivo es que se propone la inhibición de ATG4 como una estrategia terapéutica. Incluso hay autores que para apoyar esta teoría, sugieren que la cruzipaina (principal cisteína proteasa de *T. cruzi* involucrada en el proceso de diferenciación del parásito en sus diferentes estadios), puede estar participando en el proceso de autofagia y como inhibidores de esta enzima han resultado ser muy efectivos, inhibidores de la ATG4 podrían ser igual o más efectivos en el tratamiento de esta parasitosis [19]. Un segundo enfoque plantea que conviene exacerbar la autofagia, dado que una autofagia aumentada mata al parásito. Se han descrito compuestos naturales y semisintéticos que inducen autofagia de *T. cruzi*, sobre epimastigotes e incluso sobre tripomastigotes [20] en donde se resalta la importancia de esta forma de muerte promovida por estos agentes.

### *1.2.2.2. Métodos para estudio de autofagia*

Así como se ha mencionado anteriormente para la muerte por apoptosis existen numerosos métodos para el estudio de la muerte por autofagia:

- a) Microscopía de fluorescencia: ya sea por inmunofluorescencia indirecta, usando anticuerpos específicos anti-ATG8.1 [18b, 19], o usando monodansilcadaverina [20a] una sonda fluorescente que se acumula en las vacuolas autofágicas.
- b) MET: permite observar las ultra-estructuras celulares características del proceso [18-20], como ser el incremento en el número de vesículas autofágicas, retículo endoplasmático rodeando organelos y estructuras citosólicas, estructuras de membrana concéntrica y autofagosomas.
- c) Técnicas de biología molecular: como por ejemplo RT-PCR para evaluar la expresión de los ATGs [19].

Estas metodologías se pueden combinar con el uso de inhibidores de autofagia, como wortmanina o 3-MA [20a], los cuales bloquean el proceso de autofagia por inhibición de la PI3K, enzima involucrada en la regulación de la autofagia.

### *1.2.3. Necrosis*

La definición de necrosis es negativa, ya que se considera como tal aquel tipo de muerte sin signos de apoptosis o autofagia. Designa cualquier muerte celular caracterizada por una importante tumefacción, ruptura de la membrana plasmática, dilatación de organelos citoplasmáticos (mitocondria, retículo endoplasmático y aparato de Golgi), con moderada condensación de la cromatina. Finalmente la membrana celular se rompe liberando el contenido celular [7, 20b].

#### *1.2.3.1. Métodos para estudio de necrosis*

Los métodos más utilizados para el estudio de muerte por necrosis se basan en la pérdida de integridad de la membrana plasmática e incluyen:

- a) microscopía óptica: permite a través del uso de tinción con AT observar cuales células tienen dañada su membrana celular [21a],
- b) microscopía de fluorescencia o citometría de flujo: utilizada para revelar la tinción con IP [21b, 22].

### 1.2.3.2. Necrosis programada [7]

Se han descrito dos tipos de muerte que presentan características morfológicas de necrosis pero que a diferencia de la típica necrosis, son muerte celulares programadas: la necroptosis y la muerte necrótica mediada por PARP1. La necroptosis se inicia con el estímulo del factor TNF $\alpha$  sobre su receptor y con el posterior reclutamiento y activación de un complejo de señalización intracelular que involucra el adaptador RIP1, pero no el complejo TRADD–RIP1, el cual media la activación del NF- $\kappa$ B y la apoptosis. La activación de la necroptosis requiere la actividad quinasa de RIP1, la cual no es requerida por la vía NF- $\kappa$ B y el proceso apoptótico. La naturaleza diferente de la apoptosis y la necroptosis se demuestra por el descubrimiento, en diferentes tipos celulares, de una serie de moléculas denominadas necrostatinas capaces de inhibir específicamente y eficientemente la necroptosis pero no la apoptosis inducida por TNF $\alpha$ . RIP1 es translocado a la mitocondria lo cual lleva a la disrupción de la asociación ANT con ciclofilina D y esto puede explicar la rápida disfunción mitocondrial que se asocia con la necroptosis. Por otro lado, PARP1 es una enzima nuclear que juega un rol en el mantenimiento de la estabilidad del genoma. PARP1 es rápidamente activado cuando las hebras del ADN se rompen y recluta factores que reparan el ADN por enlace de unidades de ribosa-ADP a las proteínas asociadas a la cromatina. La pérdida de PARP1 lleva a un incremento del daño del ADN. Esta enzima puede mediar la muerte celular en distintos escenarios. Por un lado, el daño del ADN por alquilación promueve una rápida depleción del NAD<sup>+</sup> citosólico mediado por PARP1, lo cual lleva a una muerte por necrosis por “colapso energético” en células glicolíticas (células que dependen del NAD<sup>+</sup> citosólico para la glicólisis y para la generación de energía). PARP1 también media la muerte celular que es inducida por daño secundario del ADN asociado con injuria neuronal aguda. En este caso, la muerte de neuronas excitatorias conduce a la translocación de polímeros de poli-ribosa-ADP hacia el citosol, gatillando la translocación del AIF desde la mitocondria al núcleo, donde este media la muerte celular.

### 1.3. Uso de RMN para estudios del tipo de muerte celular

Las modificaciones de las señales de ML por <sup>1</sup>H-RMN vienen siendo utilizadas en la identificación de muerte por apoptosis de células de mamíferos malignas *in vitro* e *in vivo* inducidas principalmente por agentes anticancerosos [23].

Las señales de ML visibles por <sup>1</sup>H-RMN han sido muy bien caracterizadas en células de mamíferos [17]. Aunque es de destacar que no todas las células dan origen a este tipo de resonancia, así por ejemplo, no se han detectado en el cerebro normal. Estas señales son un grupo de resonancias que se originan principalmente a partir de cadenas móviles de ácidos grasos de triglicéridos (TG) con contribuciones menores de ácidos grasos libres y de ésteres de colesterol (CE). En la Fig. 8 se muestra el espectro de <sup>1</sup>H-RMN de células de glioma de cerebro de rata comparado con el espectro de los lípidos de estas mismas células extraídos como forma de identificar las señales correspondientes a los diferentes componentes que se visualizan *in vivo*. Considerando los principios básicos de la RMN, las señales de los protones de lípidos surge de moléculas isotropicamente desordenada ("*isotropically tumbling*"), con suficiente movilidad molecular. Para grandes moléculas inmóviles la relajación transversal ( $R_2 > 10^5 \text{ s}^{-1}$ ) es muy eficiente lo que da origen a picos anchos y pérdida de resolución en RMN. De esta manera, para que las moléculas puedan detectarse por <sup>1</sup>H-RMN *in vivo*, su "*tumbling*" no debe restringirse por ninguna orientación espacial.

Por otro lado, el desplazamiento químico no sólo es afectado por factores intra e intermoleculares sino que también por los efectos de susceptibilidad

magnética. Como ejemplo de los efectos de susceptibilidad magnética *in vivo*, lípidos dentro de estructuras cilíndricas muestran una variación del desplazamiento químico como función de la orientación cilíndrica relativa al campo magnético, entonces los efectos de susceptibilidad magnética varían. Sin embargo, lípidos ubicados dentro de vesículas citoplasmáticas de diámetro micrométrico, rodeadas de espacios homogéneos resuenan a la misma frecuencia que lo hacen en solución.

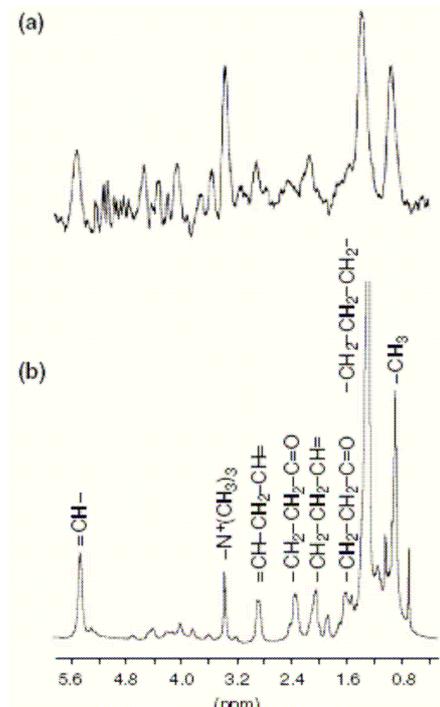


Fig. 8. (extraída de la referencia [24]): a) Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN *in vivo* de ML de un glioma de cerebro de rata BT4C. b) Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN *in vitro* de ML de un tejido de glioma de cerebro de rata BT4C, extraído en cloroforno deuterado. El tipo de protón que da origen a cada señal se muestran encima de la misma.

Se ha planteado que existen dos fuentes diferentes de este tipo de señales. Por un lado, TG asociados con microdominios globulares de membrana y por otro, TG dentro de Cuerpos lipídicos (CLs) [24]. El primer modelo se origina a partir de una ruptura en extremos hidrofóbicos de la membrana plasmática, de forma que los TG pueden formar momentáneamente estos microdominios globulares, de 22-28 nm de diámetro, que se intercalan en la membrana. No se conocen con exactitud el origen y las funciones que cumplen estas estructuras. El segundo modelo sugiere que estas señales provienen de CLs intracelulares, adyacentes a la membrana plasmática o dentro del citoplasma. Estos tienen un diámetro de 0,1-50 micras y almacenan lípidos neutros tales como TG y CE, DG o PL. Se desconoce el origen de estas estructuras, sin embargo, a nivel del retículo endoplasmático se ha caracterizado el proceso de formación de estos CLs. Ésta se inicia como un brote de membrana como resultado de la ruptura de la bicapa lipídica, proceso que es facilitado por la existencia de enzimas biosintéticas, “metabolons” (Fig. 9).

La apoptosis se asocia con un aumento de la intensidad de la señal del agrupamiento metileno,  $\text{CH}_2$  (a un desplazamiento químico  $\delta$  - a aproximadamente 1,3 ppm) mientras que la intensidad de la señal del agrupamiento metilo,  $\text{CH}_3$  (a aproximadamente 0,9 ppm) prácticamente no cambia [17,23c] y por ello la señal del metilo puede ser usada como referencia interna y emplear el cociente de la integración  $\text{CH}_2/\text{integración } \text{CH}_3$  para evaluar las variaciones de la señal del metileno en procesos de muerte.

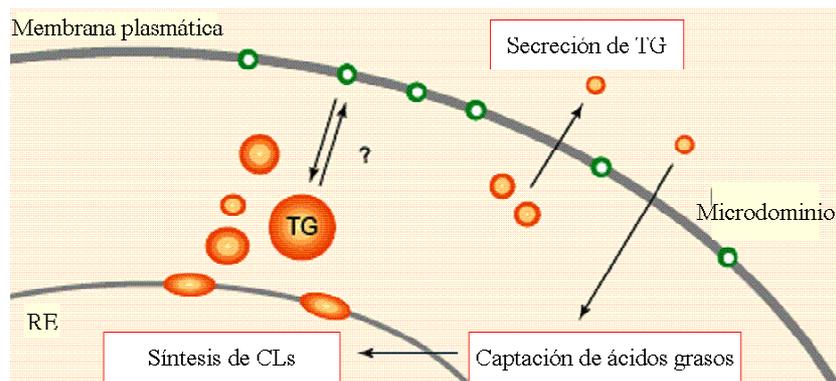


Fig. 9. (extraída de la referencia [24] y traducida al español): Los CLs (naranja) se producen a partir del retículo endoplasmático (RE). Los microdominios de membrana (verde) se hallan intercalados con la membrana plasmática. Los factores que contribuyen a la acumulación de CLs son el estado energético celular, la actividad lisosomal y el recambio de membrana. Se observa la movilización de los intermediarios acilCoA grasos microsomales para la producción de TG, la secreción de TG y la captación de ácidos grasos. Se desconoce la interacción de los CLs y los procesos metabólicos asociados con los microdominios de membrana.

La muerte celular por apoptosis se acompaña de cambios en la membrana tales como alteraciones en el empaquetamiento de lípidos en la bicapa lipídica, disminución de la viscosidad de la membrana, pérdida de la asimetría de la membrana con exposición de PS, disrupción de la arquitectura del citoesqueleto. En un principio se consideró que todo esto podría alterar el perfil de los ML, llevando al mencionado incremento de la señal del metileno. Posteriormente surgieron evidencias que confirmaron cambios en la composición de lípidos de membrana consecuencia del incremento de la actividad lipasa o la producción de ácidos grasos [17]. Asimismo, se ha encontrado que la fosfolipasa A2, una enzima involucrada en perturbaciones de membrana en procesos apoptóticos, favorece la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados en tejidos apoptóticos [25]. Esta enzima podría facilitar el recambio de PC a lysoPC por hidrólisis de ácidos grasos poliinsaturados en la posición *sn*-2 del fosfolípido, generándose así ácidos grasos libres poliinsaturados que serían los responsables del aumento del cociente de las señales  $CH_2/CH_3$  en procesos apoptóticos [17]. También se postuló que durante procesos apoptóticos se genera ceramida, un esfingolípido con una larga cadena insaturada, lo cual podría también explicar el mencionado incremento del cociente de las señales  $CH_2/CH_3$  [17b,23c].

También se ha señalado, en diversos trabajos, que otro fragmento interesante a ser estudiado en este tipo de espectros es el fragmento de colina cuya señal se visualiza a aproximadamente 3,2 ppm. En general se ha descrito una disminución de esta señal durante los procesos de apoptosis. Por lo que la disminución o desaparición de la señal en 3,2 ppm podría ser indicativa de muerte por apoptosis. Por lo anteriormente mencionado en estudios de muerte por apoptosis en células mamíferas se ha podido observar espectros de  $^1H$ -RMN con aumento de la relación de las señales  $CH_2/CH_3$  y disminución de la señal de  $N^+(CH_3)$  (Fig. 10) [17a,23b].

Cabe mencionar que cuando una célula sufre necrosis no se observa una variación significativa del mencionado cociente (integración  $CH_2$ /integración  $CH_3$ ) [17,23b], lo que permitiría el uso de esta técnica para diferenciar ambos tipos de muerte celular.

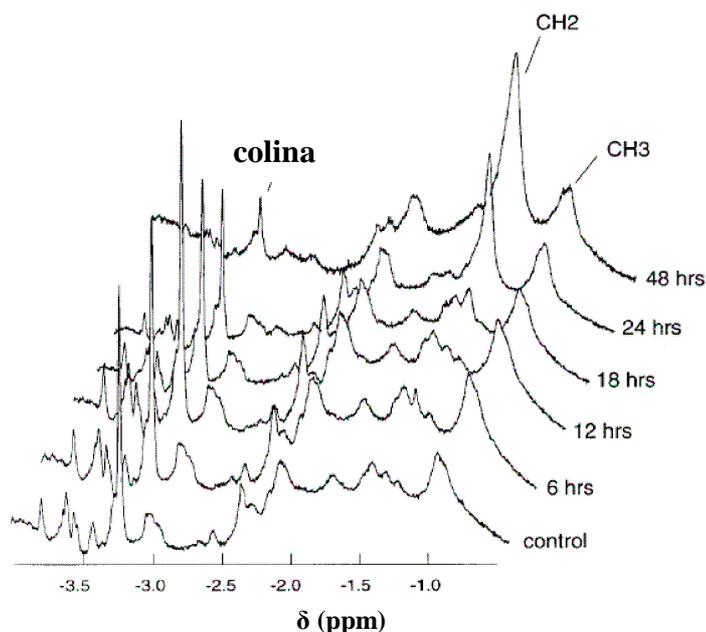


Fig. 10. (extraída de la referencia [23b]): Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN donde se muestra el incremento de la señal del  $\text{CH}_2$  y la disminución de la señal de colina de células de JURKAT tratadas con el fármaco antitumoral doxorubicina a diferentes tiempos.

#### 1.4. Metabolismo energético de los tripanosomatídeos

Los tripanosomatídeos degradan la glucosa sólo parcialmente hasta  $\text{CO}_2$ , excretando hacia el medio una considerable cantidad del carbono de la glucosa como ácidos carboxílicos. Este proceso es denominado “fermentación aeróbica” [26], para enfatizar que aunque los productos liberados al medio son similares a aquellos que otros organismos liberan cuando son expuestos a condiciones anaeróbicas, su producción ocurre en presencia de oxígeno.

Existen diversas descripciones en la literatura del uso RMN como una de principales técnicas que se emplean para el estudio de los productos del catabolismo de la glucosa en tripanosomatídeos, ya sea usando glucosa marcada con  $^{13}\text{C}$  o directamente  $^1\text{H}$ -RMN [27-30]. Estos estudios en general se combinan con ensayos enzimáticos específicos como forma de corroborar la excreción de estos metabolitos [29].

Con excepción de los tripomastigotes sanguíneos de *T. brucei*, que presentan un metabolismo energético muy simple basado en la glicólisis de la glucosa de la sangre del hospedero, el succinato es el producto universal del catabolismo de la glucosa por tripanosomatídeos [26,31]. Los demás estadios parasitarios de los diferentes tripanosomatídeos presentan un metabolismo más complejo el cual se esquematiza en la Fig. 11. Es de destacar que los datos más recientes conciernen a los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* convirtiéndose en el modelo favorito de estudio del metabolismo de tripanosomatídeos. De hecho el ARNi ha sido extensamente desarrollado en *T. brucei*. Como se muestra en la Fig. 11, la glicólisis es operativa en todos los tripanosomatídeos y no muestra grandes diferencias con la vía estándar, sin embargo, se pueden destacar dos importantes discrepancias con las células de mamíferos: 1) la mayoría de las enzimas se ubican en un organelo, el glicosoma; 2) la hexoquinasa y la fosfofructoquinasa, enzimas regulatorias claves en la mayoría de los sistemas glicolíticos, desde bacterias a mamíferos, son poco o no son afectadas en absoluto por los efectores más comunes. La casi completa falta de controles inhibitorios determinan la ausencia del “efecto Pasteur”; si bien en la mayoría de los organismos la transición de

anaerobiosis a aerobiosis se acompaña por una rápida y considerable disminución en el consumo de glucosa, es decir, el proceso de glicólisis es inhibido por oxígeno, los tripanosomatídeos no muestran dicho efecto o incluso presentan el efecto opuesto [26]. La glicólisis se organiza de tal forma que las siete enzimas que convierten glucosa en 3-fosfoglicerato están dentro del glicosoma, mientras que las últimas tres se ubican en el citosol.

Como se puede observar en la Fig. 11, el Pyr está localizado en un punto metabólico de ramificación llevando a la excreción de varios productos finales, tales como Ace, Ala y Lac. El Ace es el producto final que se forma en mayor cantidad en la mitocondria y es excretado por difusión simple a través de la membrana citoplasmática.

Los estadios del parásito que habitan en los insectos usan aminoácidos presentes en sus hospederos para la producción de energía. Por ejemplo, los estadios de insectos de *T. brucei*, *T. cruzi*, *Leishmania* spp. y *Crithidia* spp. viven en un ambiente rico en *L*-prolina. De hecho, los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* convierten *L*-prolina en Succ y en menor extensión en Ace cuando son incubados en un medio rico en glucosa. Sorprendentemente, los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*, así como las formas amastigotas de *T. cruzi* y *C. fasciculata*, preferencialmente consumen glucosa cuando ambas, glucosa y aminoácidos, están disponibles.

La *L*-prolina juega un rol importante en el metabolismo energético porque, por ejemplo, se ha demostrado que los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* pueden crecer en presencia de este aminoácido y en ausencia de glucosa sin que se altere su crecimiento. También se ha demostrado que los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* convierten importantes cantidades de *L*-treonina en Gly y Ace, pero su rol metabólico no se conoce con exactitud [31].

Como se mencionó anteriormente, en la mayoría de los tripanosomatídeos el Succ es el mayor producto de excreción de la glucosa. En *T. brucei* se han identificado dos isoformas de la fumarato reductasa dependiente de NADH, una glicosomal y otra mitocondrial. La producción de Succ cae drásticamente en una cepa mutante para ambas actividades enzimáticas [32,33]. De acuerdo a este modelo, el Succ se produce a partir del PEP citosólico. La fosfoenolpiruvato carboquinasa (paso 14) y la malato deshidrogenasa (paso 16) convierten PEP en malato, el cual es convertido en fumarato por dos isoformas de la fumarasa, una citosólica (paso 17) y otra mitocondrial (paso 19). La posible existencia de actividad fumarasa glicosomal es muy cuestionable [31,32,34]. El fumarato es finalmente reducido a Succ por las isoformas mitocondrial y glicosomal de la fumarato reductasa (paso 18 y 20).

Para mantener funcionando el sistema glicolítico debe existir un sistema eficiente para la reoxidación del NADH generado en la reacción de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (paso 8). En condiciones aeróbicas este sistema es usualmente la cadena respiratoria y en condiciones anaeróbicas existen varias vías fermentativas posibles, las más conocidas, en otros sistemas, son la producción de Lac por el músculo esquelético y la producción de EtOH por las levaduras.

El principal rol de la producción de Succ (fermentación de succínico) se realiza probablemente para mantener el balance redox glicosomal, proporcionado por dos enzimas óxidoreductasas (pasos 16 y 18) permitiendo la reoxidación del NADH generado por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en la vía glicolítica (paso 8).

Comparado con la típica fermentación del ácido láctico, la cual involucra sólo una enzima óxidoreductasa (lactato deshidrogenasa), la fermentación succínica ofrece la ventaja que requiere sólo la mitad del PEP producido para mantener el balance  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . El PEP remanente es convertido en Ace, Lac, Ala y/o EtOH dependiendo de la especie. Esta ramificación de la vía catabólica de la glucosa puede proporcionar una importante flexibilidad de adaptación a rápidos cambios del medio [31].

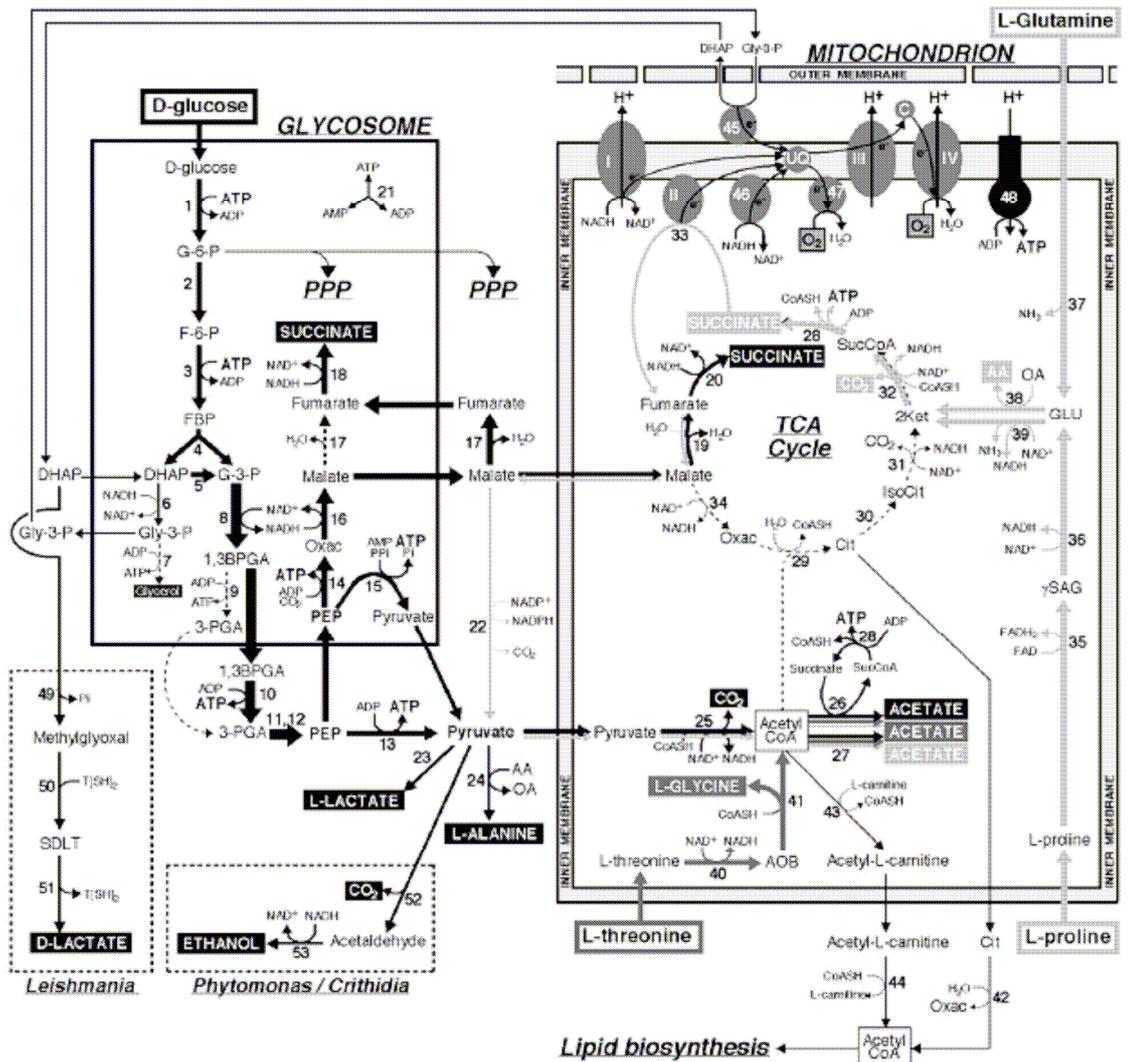


Fig. 11. (extraída de la referencia [31]): Metabolismo de las fuentes de carbono en tripanosomatídeos en un medio rico en glucosa. Flechas oscuras, grises y grises claras representan los pasos enzimáticos del metabolismo de D-glucosa, L-treonina y L-prolina/L-glutamina, respectivamente. Los productos finales excretados (Ace, Ala, glicerol, Gly, Lac, Succ y  $\text{CO}_2$ ) de D-glucosa, L-treonina y L-prolina/L-glutamina están escritos con letras blancas en rectángulos negros, grises o grises claros, respectivamente. Las flechas con diferente grosor representan el flujo metabólico de cada paso enzimático.

Las flechas punteadas indican pasos que posiblemente ocurren en un bajo nivel o no ocurren. Se muestra el compartimento glicosomal, el compartimento mitocondrial, el ciclo de los TCA, el vínculo con la vía de las pentosas fosfato (PPP) y la biosíntesis de lípidos. La membrana mitocondrial externa, que es permeable a metabolitos, sólo se muestra en la vecindad de la cadena de transporte de electrones. Las vías de producción de D-lactato y EtOH (rectángulos punteados) sólo han sido observados en *Leishmania* spp. y *Phytomonas/Crithidia*, respectivamente. Las enzimas involucradas en este proceso catabólico son: 1, hexoquinasa; 2, glucosa-6-fosfato isomerasa; 3, fosfofructoquinasa; 4, aldolasa; 5, triosafofato isomerasa; 6, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; 7, glicerol quinasa; 8, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; 9, fosfoglicerato quinasa glicosomal; 10, fosfoglicerato quinasa citosólica; 11, fosfoglicerato mutasa; 12, enolasa; 13, piruvato quinasa; 14, fosfoenolpiruvato carboquinasa, 15, piruvato fosfato diquinasa; 16, malato deshidrogenasa glicosomal; 17, fumarasa glicosomal y mitocondrial; 18, fumarato reductasa glicosomal dependiente de NADH; 19, fumarasa mitocondrial; 20, fumarato reductasa mitocondrial dependiente de NADH; 21, adenilato quinasa glicosomal; 22, enzima málica; 23, enzima desconocida; 24, alanina aminotransferasa; 25, complejo piruvato deshidrogenasa; 26, acetato:succinato CoA-transferasa; 27, enzima desconocida; 28, succinil-CoA sintasa; 29, citrato sintasa; 30, aconitasa; 31, isocitrato deshidrogenasa; 32, complejo 2-cetoglutarato deshidrogenasa; 33, succinato deshidrogenasa (complejo II de la cadena respiratoria); 34, malato deshidrogenasa mitocondrial; 35, L-prolina deshidrogenasa; 36, pirrolina 5-carboxilato deshidrogenasa; 37, L-glutamina deaminasa; 38, glutamato aminotransferasa; 39, glutamato deshidrogenasa; 40, L-treonina deshidrogenasa; 41, acetyl-CoA: glicina C-acetiltransferasa; 42, citrato liasa; 43 y 44, acetyl-L-carnitina transferasa; 45, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD; 46, NADH deshidrogenasa insensible a rotenona; 47, oxidasa alternativa; 48,  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP sintasa; 49, reacción espontánea; 50, glioxalasa I; 51, glioxalasa II; 52, piruvato descarboxilasa; 53, alcohol deshidrogenasa ligada a NAD; complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria.

Otro nivel de flexibilidad importante del metabolismo de este parásito se manifiesta en el hecho que puede optar entre la fermentación succínica versus la respiración. De hecho *T. brucei* presenta una lanzadera glicerol 3-fosfato, la cual puede ser empleada para mantener el balance redox, alimentando la cadena de transporte de electrones. Incluso se ha demostrado que la depleción de la actividad de la fumarato reductasa glicosomal en los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*, no afecta su velocidad de crecimiento, sugiriendo que una ruta alternativa es usada en lugar de dicho paso [32].

La fermentación succínica también ocurre en la mitocondria, aunque su rol manteniendo el balance redox es discutible debido a la presencia de la NADH deshidrogenasa asociada a la cadena de transporte de electrones (complejo I y paso 46).

La acetil-CoA es un metabolito intermedio en el cruce de las rutas catabólicas y anabólicas. En la mayoría de los tripanosomatídeos el catabolismo de las mayores fuentes de carbono (glucosa, *L*-prolina, *L*-treonina) conduce a la formación de acetil-CoA. El Pyr producido a partir de glucosa por glicólisis es descarboxilado a acetil-CoA por el complejo piruvato deshidrogenasa (paso 25). A su vez la acetil-CoA no sólo proviene del metabolismo de la glucosa sino que también puede provenir del metabolismo de aminoácidos como *L*-prolina y *L*-treonina. La acetil-CoA no alimenta el ciclo de los TCA sino que la mayoría del mismo se convierte en Ace el cual es excretado. El Ace es producido por un ciclo de dos enzimas: la acetato: succinato CoA-transferasa (paso 26) que transfiere el agrupamiento CoA de la acetil-CoA al Succ, dando Ace y succinil-CoA que es subsecuentemente reconvertido en Succ por la succinil-CoA sintasa (paso 28) con la concomitante producción de ATP. La acetil-CoA puede ser usada para la biosíntesis de lípidos, como es el caso de los tripomastigotes procíclicos de *T. brucei*, donde la glucosa y la *L*-treonina resultaron ser sustratos para la biosíntesis de lípidos, a través de la producción de acetil-CoA. Como este proceso ocurre dentro de la mitocondria, mientras que la biosíntesis de ácidos grasos ocurre en el citosol, la acetil-CoA tiene que ser transferida desde la mitocondria al citoplasma. Se propone que la acetil-CoA pasa de un compartimiento a otro por la vía que involucra el paso 29 y 42 o por otra vía que involucra los pasos 43 y 44 [31].

La mayoría de los tripanosomatídeos producen Lac a partir de glucosa aunque a menudo como un producto final minoritario [26,31]. Los estadios de *T. brucei* y *Leishmania* spp. que habitan en insectos pueden excretar grandes cantidades de Lac, sin embargo ellos utilizan diferentes vías para producir *L*-lactato y *D*-lactato, respectivamente. Promastigotes de *L. Brasiliensis* contienen el sistema glioxalasa (paso 51 y 52) como una vía de detoxificación que protege del daño celular provocado por el metilglioxal, un compuesto citotóxico, mutagénico, que se forma como subproducto de la glicólisis. En el caso de *T. brucei* se asume que *L*-lactato proviene del Pyr por la acción de la *L*-lactato deshidrogenasa, sin embargo el genoma de *T. brucei* no contiene su gen y no se ha detectado actividad *L*-lactato deshidrogenasa.

Por otro lado la maquinaria enzimática para el metabolismo oxidativo está completa en la mayoría de los estadios parasitarios. Esto incluye una cadena respiratoria funcional capaz de generar un gradiente de protones, así como también dos oxidasas terminales independientes (la citocromo oxidasa cianuro sensible-complejo IV y la oxidasa alternativa salicilhidroxámico sensible, paso 47). En un medio rico en glucosa, la mayoría del ATP es producido por fosforilación a nivel de sustrato (pasos 10, 13 y 28), mientras que en medios pobres en glucosa, pero ricos en aminoácidos, la fosforilación oxidativa se convierte en la principal fuente de energía. No se conoce con exactitud como es que se regula la producción de energía en los tripanosomatídeos.

La fermentación aeróbica puede ser una consecuencia directa de la alta capacidad del flujo glicolítico, como puede ejemplificarse con los tripomastigotes sanguíneos de *T. brucei*: la elevada concentración de glucosa en sangre es compatible con la producción de ATP

a partir de la glicólisis. Bajo estas condiciones el metabolismo oxidativo no sería necesario y por ello se expresan en baja proporción las enzimas del ciclo de los TCA y los componentes de la cadena respiratoria, a pesar de la presencia de oxígeno (el cual jugaría de todas formas un rol importante removiendo el exceso de los equivalentes de reducción a través de la oxidasa alternativa).

Como se mencionó anteriormente, los estadios de tripanosomatídeos que habitan en los insectos crecen en medios ricos en aminoácidos, prefiriendo a la glucosa frente a los aminoácidos, cuando crecen en medios ricos en ambos alimentos. Medios con una alta concentración de glucosa, combinado con la falta del "efecto Pasteur", determinan un elevado flujo glicolítico para la generación de ATP por fosforilación a nivel de sustrato. Consecuentemente se disminuye la funcionalidad del metabolismo oxidativo.

## 2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

### 2.1. I+D de nuevos fármacos antichagásicos

Se ha planteado que aquellos compuestos que producen estrés oxidativo por ciclado redox pueden constituir potenciales fármacos antichagásicos, dado que serán selectivamente reducidos por óxidorreductasas únicas del parásito. De acuerdo a este razonamiento en nuestro laboratorio se ha investigado la búsqueda de compuestos menos tóxicos y más selectivos, utilizando como grupo bioreducible, capaz de afectar el metabolismo redox del parásito, al grupo funcional *N*-óxido (Fig. 12).

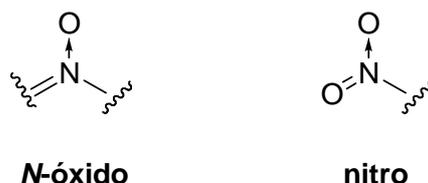


Fig. 12. Funcionalidad *N*-óxido y su similitud estructural con el grupo nitro presente en los agentes de uso en terapia

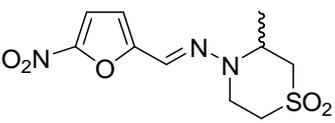
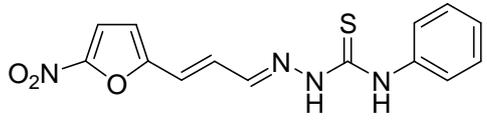
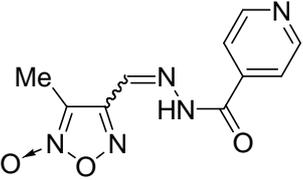
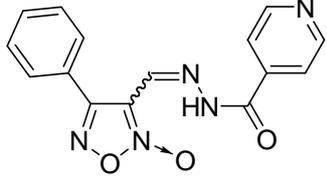
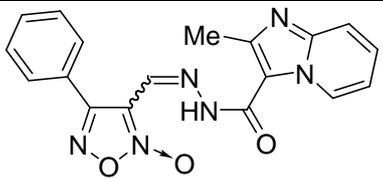
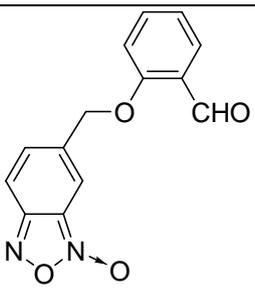
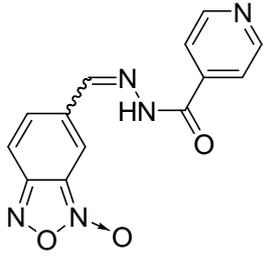
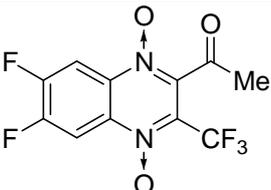
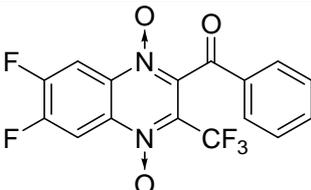
Es así que en nuestro laboratorio se han sintetizado y evaluado *in vitro*, frente a epimastigotes de *T. cruzi*, un gran número de estos compuestos, pertenecientes a distintas familias estructurales, a saber di-*N*-óxido de quinoxalinas, benzofuroxanos, *N*-óxido de benzimidazoles, *N*-óxido de indazoles, furoxanos, entre otras, presentando un amplio rango de actividades [35-45] (algunos ejemplos se muestran en la Tabla 1). Asimismo, también se han realizado ensayos *in vivo* de algunos de estos compuestos, en un modelo murino agudo de la enfermedad de Chagas, obteniéndose resultados equivalentes a los obtenidos con los fármacos de referencia [44].

<b>Tabla 1. Ejemplos de compuestos más característicos desarrollados por nuestro grupo.</b>			
Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) <i>T. cruzi</i> , epimastigotes <sup>a,b</sup>	Actividad anti- <i>T. cruzi</i> , tripomastigotes	Actividad anti- <i>T. cruzi</i> <i>in vivo</i> <sup>b</sup>
 Benzofuroxano	7,5	ND <sup>c</sup>	SI
 Di- <i>N</i> -óxido de benzimidazol	12,5	SI	SI
 <i>N</i> -óxido de indazol	16,5	SI	ND
 Di- <i>N</i> -óxido de quinoxalina	5,0	ND	ND

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> Bnz = 8,5 μM, IC<sub>50</sub> Nfx = 7,7 μM [37]. <sup>b</sup> Tulahuen 2. <sup>c</sup> ND, no existen estudios.

De este estudio Químico-Médico se han identificado prototipos moleculares y candidatos a fármacos que han planteado la necesidad de identificar el mecanismo de acción de los mismos. Así se ha estudiado si el mecanismo de acción de algunos de estos derivados es el estrés oxidativo/nitrosativo [5] y se ha concluido que éste no parecería ser el mecanismo principal para la mayoría de ellos. Por otro lado se ha estudiado, a través de quimioinformática, una población de 200 *N*-óxido de diferentes familias de heterociclos obteniéndose ciertas conclusiones sobre los requerimientos estructurales para la actividad anti-*T. cruzi* [5c].

En base a estas consideraciones se seleccionan de nuestra quimioteca para evaluar en este trabajo de tesis compuestos pertenecientes a tres diferentes familias de *N*-óxido de heterociclo-aromático (tres furoxanos, Fx1, Fx2 y Fx3, dos benzofuroxanos, Bfx1 y Bfx2 y dos di-*N*-óxido de quinoxalinas, Qdo1, Qdo2) y un nitrofurano (Nf1) (Tabla 2) [46,47].

<b>Tabla 2. Estructura de los compuestos en estudio.</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>Nfx</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Nf1</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>Fx1</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Fx2</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>Fx3</b></p>	
 <p style="text-align: center;"><b>Bfx1</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Bfx2</b></p>
 <p style="text-align: center;"><b>Qdo1</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>Qdo2</b></p>

De todos los compuestos seleccionados para estudiar en este proyecto de tesis cabe mencionar que todos fueron muy activos frente a epimastigotes de *T. cruzi* a excepción del

furoxano Fx1 que no es activo. Éste fue seleccionado como control negativo de la población de estudio. Los restantes furoxanos además han resultado activos en amastigotes de *T. cruzi* y los dos di-*N*-óxido de quinoxalinas han demostrado ser activos en ensayos *in vivo*. Por otro lado, se incorpora un nitrofurano, Nf1 porque ciertos estudios preliminares indicaban la posibilidad que fuese un agente que promoviera muerte por apoptosis.

## 2.2. Objetivos generales

Determinar el tipo de muerte celular y comprender el mecanismo de acción de los compuestos seleccionados.

El conocimiento del mecanismo de acción y el tipo de muerte que provocan estos compuestos permitirá reconocer familia de moléculas con mejor eficacia terapéutica, lo que llevará al descubrimiento de nuevos fármacos para esta enfermedad.

## 2.3. Objetivos específicos

1. Corroboración de la actividad antiproliferativa de los compuestos sobre epimastigotes de *T. cruzi*.

2. Caracterización del tipo de muerte celular:

2.1. determinación por microscopía óptica de la vitalidad del parásito después de someterse al tratamiento con los agentes en estudio

2.2. determinación de parámetros que den cuenta de un proceso de muerte por necrosis

2.3. determinación de parámetros que den cuenta de un proceso de muerte por apoptosis

2.4. determinación de parámetros indicativos de muerte por autofagia

2.5. puesta a punto e implementación de técnicas de  $^1\text{H}$ -RMN para estudiar el tipo de muerte celular en epimastigotes de *T. cruzi*

3. Caracterización biológica *in vitro* del modo de acción:

3.1. determinación el cambio metabólico en *T. cruzi* por  $^1\text{H}$ -RMN

3.2. determinación de la actividad inhibitoria de enzimas deshidrogenasas mitocondriales

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Consideraciones generales

Para todos los ensayos, en el día que se realizan los experimentos, se preparan las diluciones del compuesto en estudio en DMSO a partir de una solución madre de 200 mM preparada en el momento y se agregan inmediatamente a la suspensión de células correspondiente, de forma que la concentración final de DMSO sea menor al 1 %. En todos los ensayos se incluyen, un control negativo con DMSO y Nfx como compuesto tripanosomicida de referencia.

Se emplean reactivos comerciales: ALDRICH, JANSSEN, FLUKA, SIGMA, entre otros.

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN se realizan en un equipo Bruker AVANCE DPX-400 que trabaja con el programa Topspin 1.3. Éste opera a 400,132 MHz, a 22,16 °C, usando un pulso de 90 °, con un tiempo de adquisición de 1,3664 segundos, abarcando un ancho espectral de 14,983 ppm. El número de acumulaciones de los espectros depende del tipo de ensayo a realizar. La señal del protón del disolvente (agua) se suprime por la técnica de “Watergate” implementada en el programa Topspin [27]. Los espectros son procesados usando el programa MestRe-C NMR [48].

Cultivos de *T. cruzi*. Para el ensayo de actividad antiproliferativa, microscopia óptica, MET, MTT y  $^1\text{H}$ -RMN, epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2 o Y) se cultivan a 28 °C en medio axénico constituido por una infusión cerebro-corazón (33 g/L), triptosa (3 g/L), hemina (0,02 g/L), *D*-(+)-glucosa (0,3 g/L), estreptomycin (0,2 g/L) y penicilina (200000 U/L) complementado con 10 % de suero bovino fetal [49]. Para los estudios por la técnica de TUNEL y la tinción con IP, epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Y o clon CL Brener) se cultivan a 28 °C en medio líquido axénico Diamond, NaCl (0,106 M),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (29 mM),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (23 mM), triptosa (12,5 g/L), triptona (12,5 g/L) y extracto de levadura 12,5 (g/L), a pH 7,2, suplementado con 10 % de suero fetal bovino, hemina (7,5 mM) y antibióticos (penicilina, 75 U/mL–estreptomycin, 75 mg/mL) [11]. Todos los cultivos, así como todos los ensayos se realizan en condiciones de aerobiosis. En todos los ensayos se trabaja con parásitos en fase exponencial de crecimiento (se utilizan cultivos de 5-7 días de crecimiento, partiendo al día 0 de un repique de 5 millones de parásitos/mL). Todos los resultados obtenidos son la media de por lo menos tres experimentos independientes.

Medición de actividad antiproliferativa [50]. Se prepara una suspensión de parásitos (cepa Tulahuen 2 o Y) con una concentración de 4 millones de células/mL y se inoculan 0,6 mL/pocillo en una placa de 24 pocillos. Se preparan las diluciones del compuesto en estudio en DMSO a partir de una solución madre de 200 mM preparada en el momento y se agregan inmediatamente a cada pocillo (5  $\mu\text{L}$ /pocillo). Los parásitos son incubados con los compuestos a 28 °C por 5 días. El crecimiento de los parásitos se sigue midiendo el incremento de absorbancia a 610 nm, la cual es proporcional al número de células [49]. El porcentaje de inhibición se calcula según:  $\% = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$ , donde  $A_p$  es  $A_{610}$  del cultivo conteniendo el compuesto al día 5;  $A_{0p}$  es  $A_{610}$  del cultivo conteniendo el compuesto inmediatamente luego de la adición del compuesto (día 0);  $A_c$  es  $A_{610}$  del cultivo en ausencia de compuesto (control negativo) al día 5;  $A_{0c}$  es  $A_{610}$  en ausencia del compuesto al día 0. La  $\text{IC}_{50}$  corresponde a la concentración de compuesto capaz de provocar un 50 % de inhibición de crecimiento. Esta se determina al graficar % Inhibición de crecimiento versus Log (concentración), ajustando los puntos a una curva Sigmoidea de Boltzmann. Cada experimento se repite tres veces interdías y se calcula así la  $\text{IC}_{50}$  con su DE empleando el  $\sigma_{n-1}$ .

## 3.2. Estudio del tipo de muerte celular

### 3.2.1. Ensayo de microscopía óptica [21a]

Se prepara una suspensión de parásitos (cepa Tulahuen 2 o Y) con una concentración de 10 millones de células/mL y se inoculan 0,6 mL/pocillo, en una placa de 24 pocillos. Se evalúan por duplicado cada una de las concentraciones de interés. Los parásitos son incubados con los compuestos a 28 °C por 48 h. Se observa y registra en la planilla de resultados los cambios en: movilidad, morfología y tinción con AT, cada 30 min durante 3 h, cada 3 h hasta completar 9 h y además se observa a las 24 h y 48 h. Si los parásitos adquieren morfología redonda, entonces se tiñe con AT. Se cuentan, por duplicado, 100 células en tres experimentos independientes y se promedia el resultado, expresándolo de forma semicuantitativa: 0 - 25 %, 25 - 50 %, 50 - 75 % y 75 - 100 %.

Se utiliza un Microscopio Invertido COIC, modelo XDS-1B y las fotografías son capturadas con una cámara digital RICH T90 9,0 MP.

### 3.2.2. Ensayo de TUNEL y tinción con IP [21b,11]

Se trabaja en tubos cónicos de 1,5 mL donde se incuban 600 µL de una suspensión de 10 millones de células (cepa Y o clon CL Brener)/mL con el compuesto problema disuelto en la cantidad necesaria de DMSO, a las concentraciones de interés. Todos los ensayos se realizan por duplicado. Los parásitos tratados se incuban en estufa de 28 °C durante tiempos variables. Cada uno de los compuestos fue evaluado en condiciones (concentraciones y tiempos) en que se observa pérdida de movilidad o cambio de morfología de los parásitos, como parámetros indicativos de pérdida de vitalidad. Los parásitos en sus medios se centrifugan a 1200 g durante 5 min, se descarta el sobrenadante y se resuspenden:

1) para la técnica de TUNEL, en 100 µL de PBS, pH 7,2, se toman 30 µL y se realiza un frotis. Se fijan las células con metanol (70 %), se lava con PBS, pH 7,2. Se permeabilizan las células con Triton X – 100, se lava con PBS, pH 7,2. Se preincuba con el buffer de incubación, se marca el ADN mediante el agregado de los nucleótidos fluorescentes más la enzima TdT. Se detiene la reacción con el buffer 2 × SSC y se lava con PBS, pH 7,2. Se tiñe con DAPI (1 ug/mL), se lava con PBS, pH 7,2. Se monta y se observa en aumento 1000 ×. Como control positivo se utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En un rango de 200 a 500 µM, incubando 30 min, el índice apoptótico es 100 % [16].

2) para la tinción con IP, en 100 µL de una solución IP (1 ug/mL), se toman 30 µL, se realiza un fresco y se observa al microscopio de fluorescencia en aumento 400 ×. Se cuentan, por duplicado, 100 células y se promedia el resultado, expresándolo de forma semicuantitativa: 0 - 25 %, 25 - 50 %, 50 - 75 % o 75 - 100 % células teñidas con IP [11]. Se utiliza un Microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E400 y las fotografías son capturadas con una cámara digital Nikon Coolpix 4500. DAPI se observa a 380 – 420 nm, TUNEL a 450 – 490 nm e IP a 528 – 553 nm. Los resultados fueron cuantificados contando 200 células en duplicado, en tres experimentos independientes. El índice apoptótico es el porcentaje de las células teñidas sobre el total de las células contadas.

### 3.2.3. Ensayo de hemólisis [51,52]

Se trabaja con sangre anticoagulada con una solución de citrato de sodio (3,8 %). Se centrifuga a 200 g, 10 min a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se lava 2 veces con PBS, pH 7,2, enfriado en hielo. Se resuspenden las células en PBS, pH 7,2, para obtener una suspensión 1,5 % peso/volumen de eritrocitos. Se trabaja con 10 tubos cónicos de 1,5 mL,

para cada una de las concentraciones, de cada compuesto a evaluar. En cada tubo de reacción se colocan 400  $\mu\text{L}$  de la suspensión de eritrocitos. Como control positivo de 100 % hemólisis se utiliza 400  $\mu\text{L}$  de agua milli Q. Como control negativo de lisis se utiliza 400  $\mu\text{L}$  de PBS. Como control de agente hemolítico se utiliza anfotericina B, que produce un 50 % hemólisis a 1,5  $\mu\text{M}$  en las condiciones del ensayo. Los estudios se realizan por quintuplicado. Para cada compuesto a evaluar se agregan 400  $\mu\text{L}$  de PBS. Se determina la absorbancia de los sobrenadantes en un lector de Elisa EL 301 MICROWELL STRIP READER a 405 nm inmediatamente iniciado el experimento ( $A_0$ ). Los tubos de reacción se incuban a 37 °C durante 24 h. Transcurridas las 24 h, se centrifugan a 4 °C y se lee la absorbancia de los sobrenadantes en el lector ( $A_1$ ). Se ajusta el blanco del espectrofotómetro con el control negativo. Los resultados son expresados como porcentaje, y se calcula:  $\% = [(A_1 - A_0) / A_{1 \text{ agua milli Q}}] \times 100$ , donde  $A_1$ :  $A_{405}$  del sobrenadante al día 1,  $A_0$ :  $A_{405}$  del sobrenadante al día 0 y  $A_{1 \text{ agua milli Q}}$ :  $A_{405}$  del agua milli Q al día 1.

### 3.2.4. Identificación del tipo de muerte celular en *T. cruzi* por $^1\text{H-RMN}$

#### 3.2.4.1. Induciendo apoptosis con $\text{H}_2\text{O}_2$

Se incuban 1 mL de 150 millones de parásito, cepa Y, en medio de cultivo, a 28 °C, durante el tiempo correspondiente con el compuesto de interés. Se centrifuga a 3000 g, 10 min y se descarta el sobrenadante. El *pellet* se lava 3 veces con PBS y resuspende en 500  $\mu\text{L}$  del mismo disolvente. Estos 500  $\mu\text{L}$  se colocan en un tubo de RMN de 5 mm y se le agrega 90  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ . Se homogeneiza la suspensión de células previo a introducir el tubo en el espectrómetro de RMN.

Los espectros se adquieren realizando un total de 96 escanes y son procesados según: sobre el FID se aplica "Full FT", se ajusta la fase de forma manual (aplicando "zero order"), se corrige la línea de base aplicando "Full Auto" y se realiza el referenciado del espectro. La señal del EtOH (a 1,170 ppm) se utiliza como estándar interno.

Los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  obtenidos a partir del *pellet* de los parásitos tratados se comparan contra un "Control parásitos ML" que lleva 1 mL de una suspensión de 10 millones de epimastigotes/mL de medio de cultivo, más el disolvente en el que se disuelven los compuestos a evaluar, en la misma concentración que se le agrega a los tratados.

La molécula empleada para el estudio de procesos apoptóticos es  $\text{H}_2\text{O}_2$  [16], el tiempo de incubación 2,5 h y el disolvente agua milli Q. Las diluciones se preparan en el momento a partir de una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 vol), conservado a 4 °C en botella color ámbar.

#### 3.2.4.2. Induciendo apoptosis en la fase estacionaria de crecimiento

Se ha descrito que las características apoptóticas de epimastigotes, en medios de cultivo axénicos se acentúan en la fase estacionaria de crecimiento [11]. Como forma de evaluar los ML de los cultivos celulares en el tiempo se lleva a cabo el siguiente ensayo. Se hace un repique de 20 mL de medio con 5 millones de parásitos (cepa Y)/mL. Se toman muestras a los días 4, 7 y 14. Cada día se toma una muestra, se cuenta el número de parásitos y se evalúan las características de vitalidad de igual forma que se realiza con la microscopía óptica. Sabiendo el número de parásito de cada uno de estos días, se coloca en un tubo cónico de 15 mL un volumen de medio que contenga 150 millones. Se centrifuga a 3000 g, 10 min y se descarta el sobrenadante. El lavado, procesamiento de la muestra y procesamiento de los espectros es idéntico al mencionado en el apartado 3.2.4.1.

### 3.2.4.3. Induciendo necrosis por Nfx y Qdo2

Se prepara una suspensión de parásitos, cepa Y, con una concentración de 10 millones de células/mL y se inoculan 0,6 mL/pocillo, en placas de 24 pocillos. Para cada concentración de compuesto evaluada se incluye una placa (cantidad total de parásitos/placa es de aproximadamente 150 millones). Los parásitos son incubados con los compuestos a 300  $\mu$ M, 28 °C por 48 h para Nfx y a 200  $\mu$ M, 28 °C por 2 h para Qdo2. Se incluye una placa control que se inocula en cada pocillo con el disolvente en que se disuelven los compuestos. A final del experimento se recogen los parásitos de cada uno de los pocillos de una placa en un tubo cónico de 15 mL, se centrifuga a 3000 g, 10 min y se descarta el sobrenadante. El lavado, procesamiento de la muestra y la adquisición de los espectros de  $^1\text{H}$  RMN es idéntico al mencionado en los apartados anteriores.

### 3.2.5. Análisis ultraestructural (MET)

Para analizar la anatomía subcelular de los parásitos (cepa Y o Tulahuen), se requiere una cantidad importante de los mismos, en fase exponencial de crecimiento, lo óptimo son 400 millones. Como control de parásitos en estado normal ("Control parásitos MET") se toma un repique en fase exponencial de crecimiento, y se prepara un repique de 40 mL de 10 millones/mL, el cual se fracciona a la mitad en dos tubos cónicos de 50 mL. Se adiciona gradualmente el disolvente en que se disuelven los compuestos al 0,9 %. Se incuban estos dos tubos cónicos a 28 °C, durante 24 h. Transcurrido este tiempo se reúne el contenido de ambos tubos cónicos en uno sólo y se procesa.

Como control del proceso de autofagia ("Control autofagia") se toma un repique en fase exponencial de crecimiento y se prepara un repique de 40 mL de 10 millones/mL. Se lava este repique tres veces con PBS (3000 g, 10 min) y se resuspende en 40 mL de PBS, los cuales se fraccionan a la mitad en dos tubos cónicos de 50 mL. Se adiciona gradualmente el disolvente en que se disuelven los compuestos al 0,9 %. Se incuban estos dos tubos cónicos a 28 °C, durante 24 h. Transcurrido este tiempo se reúne el contenido de ambos tubos cónicos en uno sólo y se procesa.

En el caso de los parásitos tratados con los compuestos se trabaja de la siguiente forma: la suspensión de parásitos con una concentración de 10 millones de células/mL se distribuye en placas de 24 pocillos, 0,6 mL/pocillo. Se inocula con el compuesto de interés disuelto en DMSO a la concentración deseada. Se incuban las placas a 28 °C por 24 h. Transcurrido este tiempo se recogen los parásitos de cada uno de los pocillos de cada placa en un tubo cónico de 50 mL y se procesa.

Previo al procesamiento, la muestra se lava tres veces con PBS, centrifugándola cada vez a 3000 g durante 10 min. El *pellet* resultante de cada fracción, se fija en glutaraldehído al 2,5 % en PBS, durante 40 min a temperatura ambiente.

A continuación se elimina el glutaraldehído realizando cinco lavados en PBS (3000 g, 5 min) y se realiza una postfijación con una solución que contiene  $\text{OsO}_4$  (1 %),  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  (0,8 %) y  $\text{CaCl}_2$  (2,5 mM) durante 30 min a temperatura ambiente [20a]. Se hacen cinco lavados en agua milli Q filtrada (3000 g, 5 min).

A continuación, las muestras se deshidratan en una serie de alcoholes de graduación creciente seguidos de acetona y se embeben en baños de una mezcla de acetona con resina epóxica (Araldita Durcupan, FLUKA) de concentración creciente. La inclusión en bloque se realiza con Araldita pura dentro de cápsulas Beem, las cuales se colocan en estufa a 60 °C durante 48hs. Los cortes semifinos (0,5  $\mu$ m de espesor) se realizan en un ultramicrotomo RMC-MTX, se tiñen con azul de metileno borácico (1 %) y se estudian

con un microscopio Nikon Eclipse E200, aumento 400 ×, para seleccionar la región de la muestra a ser analizada mediante microscopía electrónica. Con el mismo ultramicrotomo y empleando una cuchilla de diamante (DIATOME) se realizan las secciones ultrafinas (40 a 60 nm) las que se colectan sobre rejillas de cobre de 200 mesh y de ranura (2x1 mm). Estas últimas se colocan, luego de recoger los cortes, sobre un film de formvar, donde se dejan secar. El contraste de los cortes se realiza por flotación en una solución acuosa saturada en acetato de uranilo ( $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) a 60 °C durante 1 h, y luego en citrato de plomo (3 %) durante 10 min en atmósfera de nitrógeno (para aumentar la densidad electrónica de la muestra). Los análisis se realizan en un microscopio electrónico de transmisión marca Jeol JEM 1010 operado a 80 kV, equipado con una cámara digital HAMAMATSU C-4742-95. Las imágenes digitales obtenidas, fueron transferidas a la computadora y luego procesadas mediante el programa Adobe Photoshop 5.0.

### 3.2.6. Estudios con inhibidor del proceso de autofagia: 3-MA [20a]

Se prepara un repique de una suspensión de 10 millones de células (cepa Y o Tulahuen)/mL. Se fracciona en dos tubos cónicos de 15 mL, en volúmenes iguales. Uno de ellos se incubó con 3-MA (20 mM), tubo tratado, y el otro con el mismo volumen del disolvente (PBS) que se agregó al primero, tubo control. Se incuban ambos tubos 2 h a 28 °C. Transcurridas las 2 h se lavan tres veces con PBS (3000 g, 10 min) y se resuspenden los parásitos en medio de cultivo en el mismo volumen inicial de forma de mantener la concentración de parásitos en 10 millones/ mL. Con estas dos tipos de muestras se desarrollan en paralelo dos ensayos de microscopía óptica con el compuesto de interés a una concentración tal que a las 24 h de incubación, a 28 °C, se observe la morfología de interés, estructuras vesiculares citoplasmáticas que vuelven redondo al parásito. Transcurrido este tiempo, se "cuantifica" el número de parásitos que presentan las siguientes características: integridad de membrana, morfología celular y movilidad, prestando especial atención a la morfología. Se compara el tratado con 3-MA contra el no tratado. El recuento en cámara de Neubauer, se realiza diluyendo con PBS (1 en 100) y contando 100 parásitos en tres experimentos independientes. Si existiese una reversión del proceso de autofagia, se esperaría una reducción del número de parásitos con dichas estructuras vesiculares citoplasmáticas, es decir, se esperaría una normalización de su morfología.

## 3.3. Estudios del mecanismo de acción

### 3.3.1. Determinación del cambio metabólico en *T. cruzi* utilizando $^1\text{H}$ -RMN [27-30]

Para evaluar el cambio del perfil metabólico que inducen los compuestos en estudio, se incubó 1 mL de 10 millones de epimastigotes, cepa Y, en medio de cultivo, a 28 °C, durante 48 h con el compuesto de interés. A las 0 h del experimento, previo a preparar el repique de 10 millones/mL, se hace un lavado para sustituir el medio de cultivo por medio de cultivo fresco, para ello se centrifuga a 3000 g, 10 min, se descarta el medio y se sustituye por medio fresco. Se incluye en cada ensayo un "Control medio de cultivo" que contiene 1 mL de medio de cultivo más el disolvente en el que se disuelven los compuestos a evaluar, en la misma concentración que se le agrega a los tratados. A las 48 h se centrifuga a 3000 g, 10 min y se toman 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante que se agrega a un tubo de RMN de 5 mm. Se le adicionan además 10  $\mu\text{L}$  de DMF (estándar interno) y 90  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ . Los espectros se adquieren realizando un total de 8 escanes y se procesan según: sobre el FID se aplica "Full FT" y se realiza el referenciado del espectro respecto al EtOH a 1,17 ppm. Los resultados se expresan como porcentaje relativo a la DMF y respecto a un "Control parásitos metabolitos" que contiene 1 mL de una suspensión de 10 millones de

parásitos/mL de medio de cultivo, más el disolvente en el que se disuelven los compuestos a evaluar, en la misma concentración que se le agrega a los tratados.

Un porcentaje positivo (+) significa un incremento en la excreción del metabolito respecto al “Control parásitos metabolitos” y un porcentaje negativo (-) implica una disminución en la excreción del metabolito respecto al “Control parásitos metabolitos”.

### *3.3.2. Determinación de la actividad inhibitoria de enzimas deshidrogenasas mitocondriales*

Este estudio es un ensayo colorimétrico que emplea MTT, el cual es reducido enzimáticamente a formazán de color azul. En tiempos menores a 4 h se puede evidenciar la actividad de deshidrogenasas mitocondriales estando el microorganismo estudiado aún viable [27]. Se prepara un repique de 20 millones de epimastigotes (cepa Y)/mL, se centrifugan y se lavan dos veces con PBS-glucosa (5,5 mM). Se resuspenden en PBS-glucosa (5,5 mM). Se distribuyen en placas de 24 pocillos y se incuban con el compuesto de interés, a la concentración deseada, a 28 °C. Transcurrido el tiempo de interés, se transfieren 100 µL a placa de 96 pocillos, se agregan 25 µL de MTT (concentración de 4 mg/mL) y se incuban 2 h a 28 °C. Se utiliza como control 100 % de crecimiento la suspensión de parásitos sin tratar. Se detiene la reacción y lisan las células con 100 µL de la solución SDS-isopropanol (10 % SDS, 50 % isopropanol, agua). Se incuba 2 h a 28 °C y se determina absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA para placas de 96 pocillos Microplate Reader mrc.

#### 4. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA

Se reevalúa la actividad antiproliferativa de los compuestos en estudio, sobre epimastigotes de *T. cruzi* empleando las cepas Tulahuen 2 y Y. Este ensayo tiene como objetivo el contar con datos en idénticas condiciones experimentales para ambas cepas de *T. cruzi*.

En la Fig. 13 se muestra a modo de ejemplo la curva dosis-respuesta correspondiente a la quinoxalina Qdo2. En la Tabla 3 se expresan las  $IC_{50} \pm 2$  DE de todos los compuestos estudiados en este proyecto de tesis.

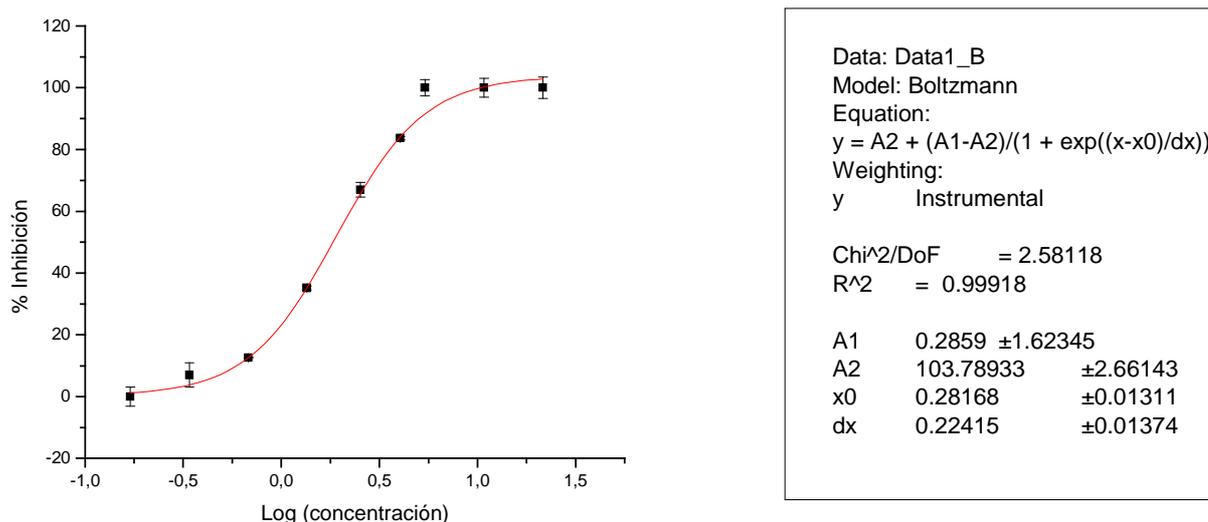


Fig. 13. Curva sigmoidea utilizada para el cálculo de la  $IC_{50}$  de Qdo2 empleando el programa OriginPro7.

Compuesto	$IC_{50} \pm 2$ DE ( $\mu$ M), cepa Tulahuen 2	$IC_{50} \pm 2$ DE ( $\mu$ M), cepa Y
Nfx	7,7 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 0,2
Nf1	1,6 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,5
Fx1	> 300,0 <sup>a</sup>	> 300,0 <sup>a</sup>
Fx2	10,8 $\pm$ 1,4	7,95 $\pm$ 0,06
Fx3	5,0 $\pm$ 0,9	14,8 $\pm$ 2,2
Bfx1	6,3 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,6
Bfx2	32,0 $\pm$ 2,6	13,3 $\pm$ 0,1
Qdo1	1,4 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,4
Qdo2	2,5 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,1
Anfotericina B	0,15 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,02

<sup>a</sup>Máxima concentración ensayada por problema de solubilidad.

Como se mencionó anteriormente en el apartado 1.1, los epimastigotes habitan en el intestino del vector, son no infectivos y fáciles de mantener en medios de cultivo. La literatura indica que según la cepa y la región geográfica de origen, el parásito puede mostrar diferencias en la susceptibilidad a los fármacos de uso clínico, Nfx y Bnz. Por este motivo es que se decide incluir dos cepas diferentes en este estudio. Es de destacar que la cepa Y de *T. cruzi* ha sido descrita como parcialmente resistente a los fármacos de referencia en estudios *in vivo* [53,54].

Todos los compuestos estudiados muestran valores de  $IC_{50}$  del orden o menores que el fármaco de referencia Nfx, excepto el derivado Fx1, cuya  $IC_{50}$  es mayor a 300,0  $\mu$ M, no pudiéndose determinar por problemas de solubilidad del compuesto al trabajar a dosis mayores. Particularmente, dentro de los compuestos en estudios en esta tesis, Bfx1, Qdo1 y Qdo2 muestran  $IC_{50}$  menores a la correspondiente a Nfx para ambas cepas en estudio. El furoxano Fx3 sobre la cepa Tulahuen 2 presenta una  $IC_{50}$  menor al fármaco de referencia, pero no ocurre lo mismo sobre la cepa Y.

La cepa Y se muestra ligeramente más sensible que la cepa Tulahuen 2 frente al fármaco de referencia. Esto también ocurre para la mayoría de los compuestos estudiados en la presente tesis, a destacar Bfx2 cuya relación de  $IC_{50}$  (Tulahuen 2/Y) es 2,4. La notable excepción a esta tendencia es Fx3 cuya relación de  $IC_{50}$  es 0,34.

Dentro del grupo de *N*-óxido de heterociclo-aromático los representantes más activos son los pertenecientes al grupo de las quinoxalinas, siendo Qdo1 5,5 y 4,1 veces más activa que Nfx frente a Tulahuen 2 y Y, respectivamente.

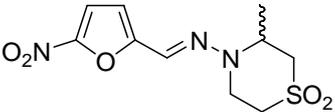
## 5. ESTUDIOS DEL TIPO DE MUERTE

### 5.1. Estudios de microscopía óptica como aproximación al análisis del tipo de muerte del parásito tratado con los compuestos en estudio

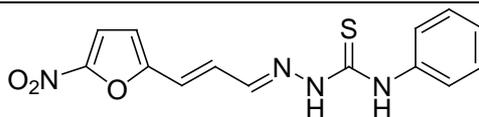
Los estudios de microscopía óptica se realizan con el objetivo de obtener información sobre el potencial tipo de muerte parasitaria promovida por cada tipo de compuesto. Excepto para el derivado Fx1, las dosis utilizadas en este estudio fueron múltiplos aproximados de las correspondientes IC<sub>50</sub> en cada una de las cepas (Tulahuen 2 y Y).

Por medio de la microscopía óptica se podrían observar la formación de potenciales cuerpos apoptóticos o determinar las condiciones en que ocurre pérdida de la integridad de la membrana de las células y posterior necrosis, empleando una coloración sencilla como lo es el AT. AT es un colorante de exclusión vital, que por sus características fisicoquímicas no tiñe las células cuya membrana está sana, pero tiñe de color azul las células cuya membrana se encuentra alterada y que finalmente mueren. Por ello, este colorante permite conocer, en estos experimentos, cual es la evolución de la vitalidad de los parásitos con el tiempo y con las concentraciones para los diferentes compuestos estudiados.

Además, este estudio permite determinar las condiciones, concentraciones y tiempos, en que efectivamente se produce muerte del parásito, dato que será utilizado en las técnicas estándares para estudios de muerte celular (TUNEL e IP). En la Tabla 4, se muestran los resultados de estos estudios.

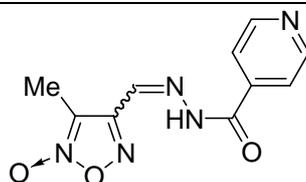
<b>Tabla 4. Resultados de microscopía óptica para los compuestos estudiados cepas Tulahuen 2<sup>a</sup> y Y<sup>b</sup> de T. cruzi.</b>															
 <b>Nfx</b>															
Concentración (μM)/tiempo (h)	Parásitos no teñidos con AT					Parásitos con morfología normal (forma y tamaño)					Parásitos con movilidad normal				
	3	6	9	24	48	3	6	9	24	48	3	6	9	24	48
7,7 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
23,1 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
38,5 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
77,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
115,5 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6,5 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
19,5 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
32,5 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
65,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
97,5 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Leyenda	■ 75 - 100 %					■ 50 - 75 %					■ 25 - 50 %				
	■ 0 - 25 %														

**Tabla 4. continuación**



**Nf1**

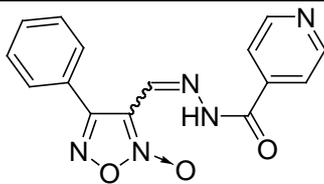
Concentración (μM)/tiempo (h)	Parásitos no teñidos con AT						Parásitos con morfología normal (forma y tamaño)						Parásitos con movilidad normal					
	1,5	3	6	9	24	48	1,5	3	6	9	24	48	1,5	3	6	9	24	48
1,7 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
5,1 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
8,5 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
17,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
25,5 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
0,65 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
1,3 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3,9 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6,5 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
13,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
19,5 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■



**Fx1**

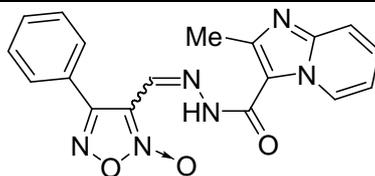
Concentración (μM)/tiempo (h)	Parásitos no teñidos con AT					Parásitos con morfología normal (forma y tamaño)					Parásitos con movilidad normal				
	3	6	9	24	48	3	6	9	24	48	3	6	9	24	48
100,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
300,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
100,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
300,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

**Tabla 4. continuación**



**Fx2**

Concentración (µM)/tiempo (h)	Parásitos no teñidos con AT					Parásitos con morfología normal (forma y tamaño)					Parásitos con movilidad normal				
	3	6	9	24	48	3	6	9	24	48	3	6	9	24	48
10,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
30,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
50,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
100,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
150,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
8,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
24,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
40,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
80,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
120,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

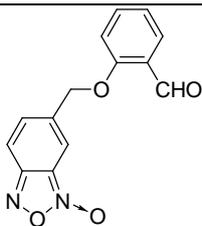


**Fx3**

Concentración (µM)/tiempos(h)	Parásitos no teñidos con AT						Parásitos con morfología normal (forma y tamaño)						Parásitos con movilidad normal					
	1	3	6	9	24	48	1	3	6	9	24	48	1	3	6	9	24	48
5,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
15,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
25,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
50,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
75,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Concentración (µM)/tiempos(h)	1	3	6	9	24	48	1	3	6	9	24	48	1	3	6	9	24	48
15 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
45 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
75 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
150 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

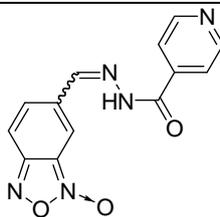
**Tabla 4. continuación**



**Bfx1**

Concentración (μM)/tiempo (h)	Parásitos no teñidos con AT:					Parásitos con morfología normal (forma y tamaño):					Parásitos con movilidad normal:				
	3	6	9	24	48	3	6	9	24	48	3	6	9	24	48
6,5 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
19,5 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
32,5 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
65,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
97,5 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

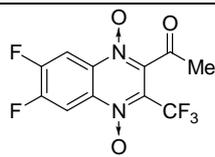
Concentración (μM)/tiempo (h)	1,5	3	6	9	24	48	1,5	3	6	9	24	48	1,5	3	6	9	24	48
4,8 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
14,4 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
24,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
48,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
72,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■



**Bfx2**

Concentración (μM)/tiempo (h)	Parásitos no teñidos con AT:					Parásitos con morfología normal (forma y tamaño):					Parásitos con movilidad normal:				
	3	6	9	24	48	3	6	9	24	48	3	6	9	24	48
30,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
90,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
150,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

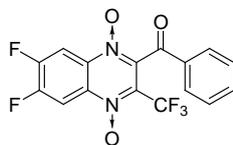
Concentración (μM)/tiempo (h)	3	6	9	24	48	3	6	9	24	48	3	6	9	24	48
13,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
39,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
65,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
130,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■



Qdo1

Concentración (μM)/tiempo (h)	Parásitos no teñidos con AT:					Parásitos con morfología normal (forma y tamaño):					Parásitos con movilidad normal:				
	3	6	9	24	48	3	6	9	24	48	3	6	9	24	48
0,89 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2,67 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4,45 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
8,9 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
13,35 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Concentración (μM)/tiempo (h)	Parásitos no teñidos con AT:						Parásitos con morfología normal (forma y tamaño):						Parásitos con movilidad normal:					
	1,5	3	6	9	24	48	1,5	3	6	9	24	48	1,5	3	6	9	24	48
1,6 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4,8 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
8,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
16,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
24,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■



Qdo2

Concentración (μM)/tiempos(h)	Parásitos no teñidos con AT:								Parásitos con morfología normal (forma y tamaño):								Parásitos con movilidad normal:							
	0,25	0,5	1	2	3	6	24	48	0,25	0,5	1	2	3	6	24	48	0,25	0,5	1	2	3	6	24	48
1,325 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2,65 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
5,3 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
15,9 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
26,5 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
39,75 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
79,5 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>a</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Concentración (μM)/tiempos(h)	Parásitos no teñidos con AT:								Parásitos con morfología normal (forma y tamaño):								Parásitos con movilidad normal:							
	0,25	0,5	1	2	3	6	24	48	0,25	0,5	1	2	3	6	24	48	0,25	0,5	1	2	3	6	24	48
1,8 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
5,4 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
9,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
18,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
27,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
200,0 <sup>b</sup>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Excepto para Fx1, para todos los compuestos se observa muerte, dependiente de la dosis y el tiempo de exposición, la cual se evidencia por tinción con AT (Fig. 14). Los cambios más notorios de los parásitos siguen un patrón similar para todos los compuestos (ver excepciones más adelante) y estos ocurren en el siguiente orden: pérdida de movilidad, redondeo celular, coloración positiva con AT, pérdida de flagelo y disminución del volumen celular. Para los compuestos que causan muerte, el efecto antiproliferativo se podría explicar por muerte del parásito y por inhibición de la proliferación, dado que, independiente del tiempo, a concentraciones relativamente bajas, ocurre disminución de la proliferación, pero no muerte.

Las quinoxalinas, especialmente Qdo2, producen una clara y rápida muerte en las condiciones en las que se realizó el ensayo de microscopía óptica (ver entradas Qdo2, Tabla 4).

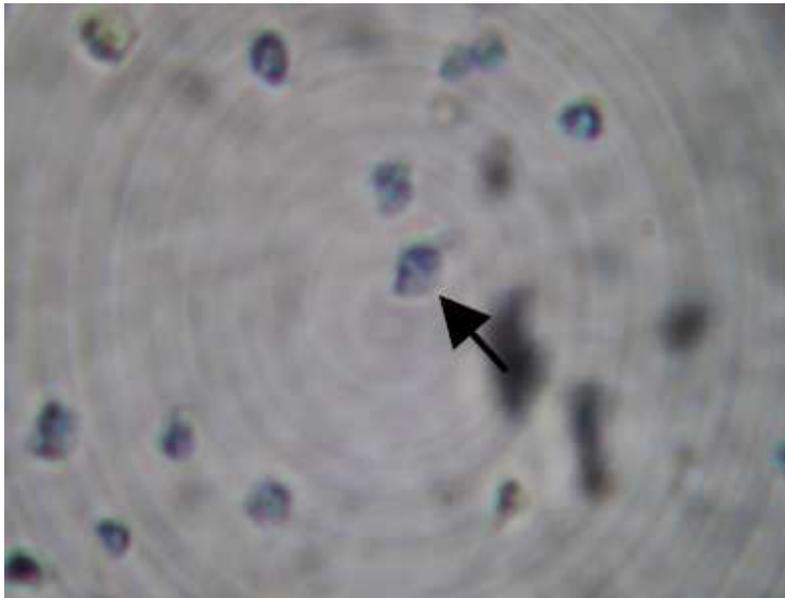


Fig. 14. Células no viables teñidas con AT. Aumento 640  $\times$ .  
*Qdo2*, cepa Y, 3 h, 18  $\mu$ M.

El compuesto Bfx2 no muestra para ninguna de las dos cepas el proceso indicado anteriormente relacionado con la muerte celular, excepto a concentraciones y tiempos elevados (200,0  $\mu$ M, a partir de las 24 h, Tabla 4 inserto Bfx2), por lo que a bajas concentraciones el efecto antiproliferativo se podría explicar por inhibición de la proliferación parasitaria.

Fx3 presenta la peculiaridad de no mostrar una clara relación dosis-respuesta por encima de 50,0  $\mu$ M. Así por ejemplo, a 200,0  $\mu$ M en ambas cepas, el compuesto no causa daño sobre el parásito sino que comienza a observarse un cambio en la vitalidad del mismo a concentraciones menores (ver Tablas 4, entrada Fx3). Esto podría explicarse por un problema de solubilidad, o de agregación, en el medio de cultivo del compuesto.

Por otro lado, los compuestos Bfx1, Nf1 y Fx3 no siguen específicamente con el proceso de muerte mencionado. Curiosamente en las siguientes condiciones:

- \* Nf1 a 5,1  $\mu$ M, 24 h sobre la cepa Tulahuen 2 y a 6,5 - 13  $\mu$ M, 24 h sobre la cepa Y,
  - \* Bfx1 a 65,0  $\mu$ M, 24 - 48 h sobre cepa Tulahuen 2,
  - \* Fx3 a 50,0  $\mu$ M 9 - 48 h, sobre la cepa Tulahuen 2 y a 45,0  $\mu$ M, 9 - 24 h sobre cepa Y,
- se aprecia una morfología muy particular, observándose como característica más relevante la formación de una estructura vacuolar citoplásmica que conduce a redondeo parasitario

pero conserva su movilidad (Fig. 15). Posteriormente, los parásitos pierden movilidad, las vesículas disminuyen de tamaño y se tiñen con AT, es decir, estos parásitos mueren.

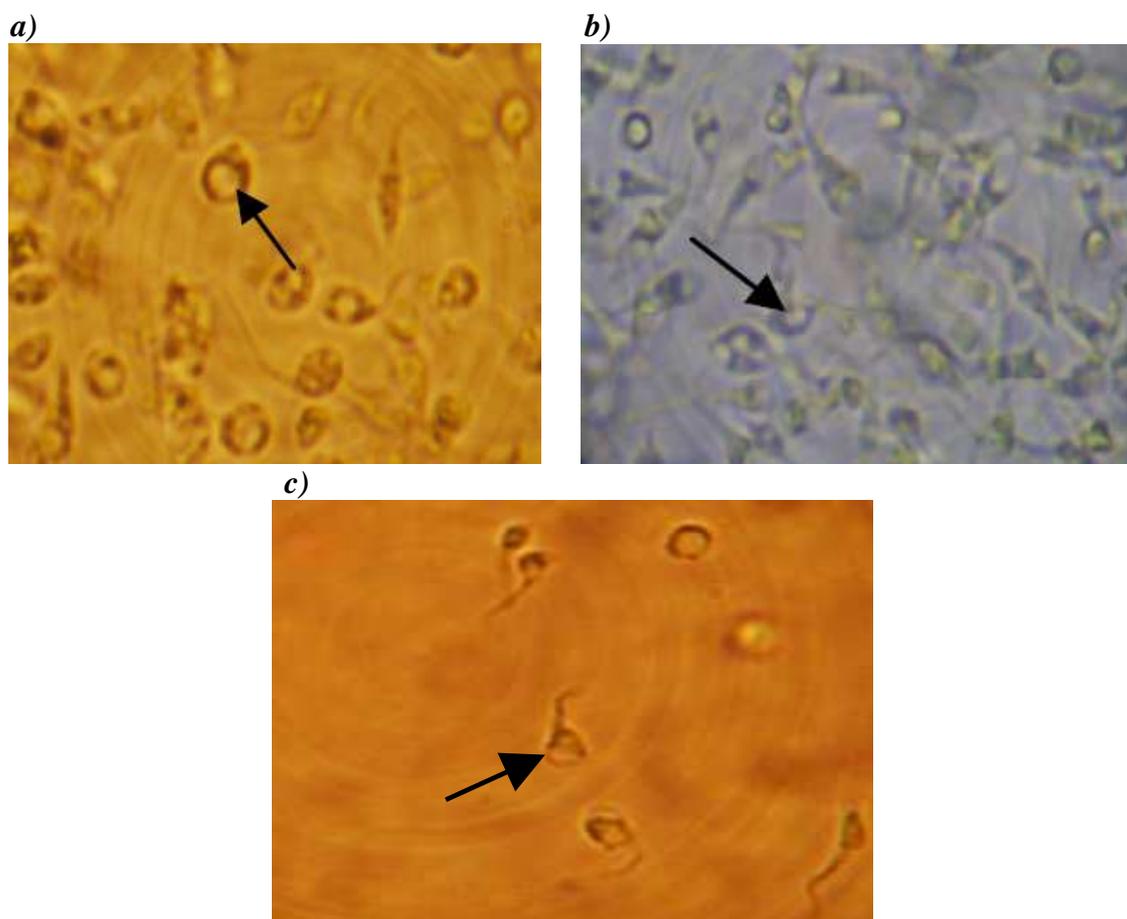


Fig. 15. Ceba Tulahuen 2, a) Bfx1, 65,0  $\mu\text{M}$ , 24 h. b) Nf1, 5,1  $\mu\text{M}$ , 24 h, c) Fx3, 50  $\mu\text{M}$ , 24 h. Aumento 640  $\times$ . Las flechas muestran las estructuras vacuolares observadas en el citoplasma parasitario.

## 5.2. Confirmación del tipo de muerte celular por las técnicas de TUNEL y tinción con IP

Estas técnicas, TUNEL y tinción con IP, son técnicas estándares para confirmar apoptosis y necrosis celular, respectivamente.

Durante el proceso de apoptosis el ADN es degradado por endonucleasas generando extremos 3'-OH libres. La técnica de TUNEL mide el ADN fragmentado de células apoptóticas por incorporación catalítica de fluoresceína-12-dUTP a los extremos 3'-OH del ADN usando la enzima TdT, formando una cola polimérica. Paralelamente, en el experimento de TUNEL se utiliza la tinción de DAPI como sonda fluorescente específica de ADN, nuclear y cinetoplástico, luego de permeabilizar las células [11, 22].

IP es un colorante de exclusión vital, es decir, es un colorante que por sus características fisicoquímicas penetra en las células cuya integridad de membrana se encuentra alterada. Se une al ADN y de esta manera tiñe células necróticas [11, 22].

Para este estudio, se tomó como guía los resultados de microscopía óptica. Las dosis utilizadas en este estudio fueron múltiplos de las correspondientes  $\text{IC}_{50}$  en la cepa Y. Dado que el compuesto Fx1 no produce muerte de los parásitos, incluso a una concentración de 300,0  $\mu\text{M}$ , no se realizaron estos estudios para el mismo.

Los resultados se resumen en la Tabla 5, en donde se muestran los tiempos y concentraciones utilizados para cada uno de los compuestos en estudio.

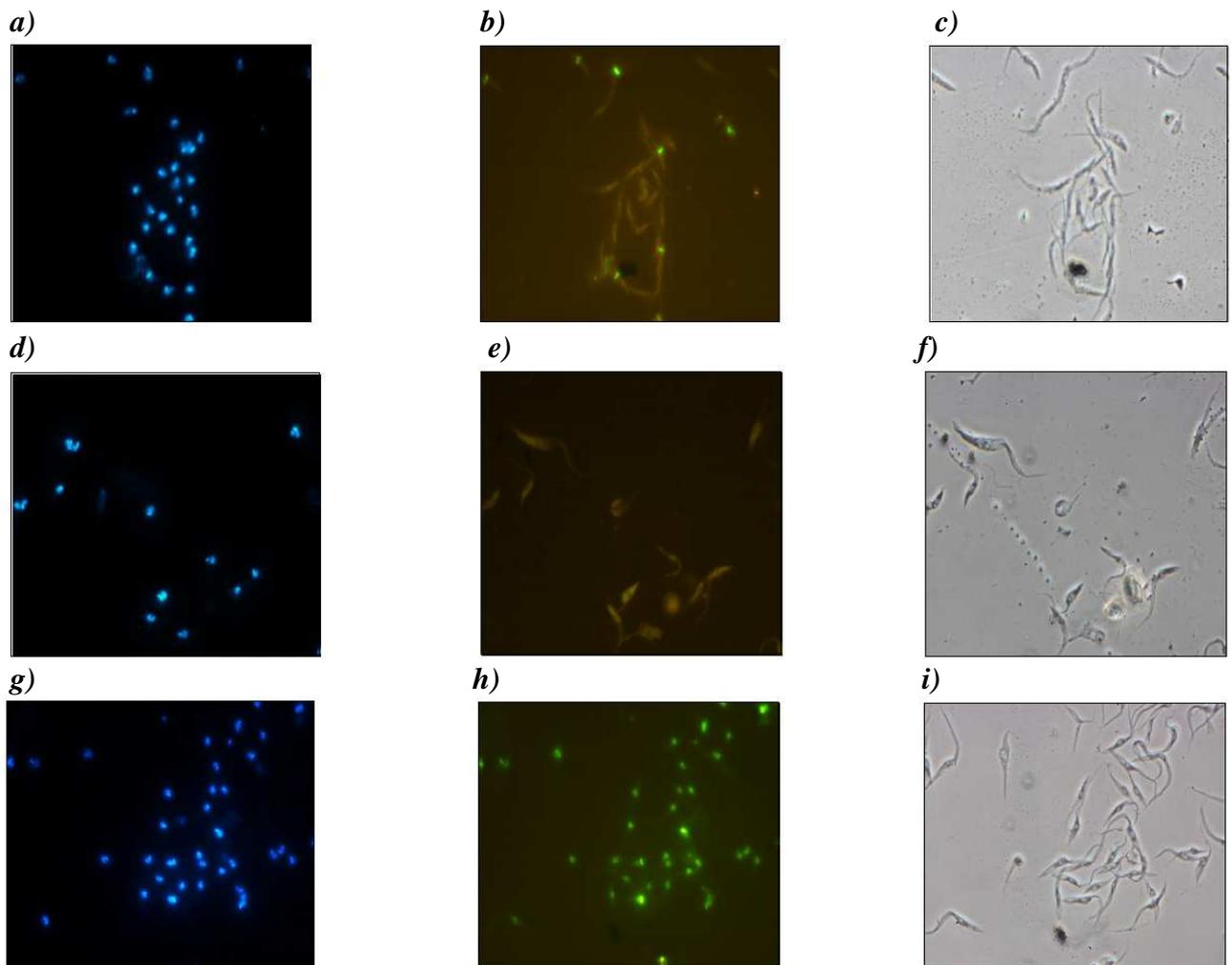
**Tabla 5. Resultados de TUNEL y de tinción con IP.**

Comp.	Conc (µM)	3 h		6 h		9 h		24 h		48 h		72 h	
		TUNEL	IP <sup>a</sup> (%)	TUNEL	IP (%)	TUNEL	IP (%)	TUNEL	IP (%)	TUNEL	IP (%)	TUNEL	IP (%)
Nfx	100,0	- <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	Neg <sup>c</sup>	50-75	-	50-75	-	-
	50,0	-	-	-	-	-	-	Neg.	0-25	-	0-25	-	-
Nf1	19,5	-	-	Neg.	0-25	-	-	Neg.	0-25	Neg.	0-25	-	-
	13,0	-	-	Neg.	0-25	-	-	Neg.	0-25	Neg.	0-25	-	-
F <sub>x</sub> 2	80,0	-	-	-	-	-	-	Neg.	50-75	Neg.	50-75	-	-
	40,0	-	-	-	-	-	-	-	0-25	-	0-25	-	-
	24,0	-	-	-	-	-	-	-	0-25	-	0-25	-	-
F <sub>x</sub> 3 <sup>d</sup>	45,0	-	-	-	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	-	-
	75,0	-	-	-	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	-	-
	150,0	-	-	-	-	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	-	-	-
B <sub>f</sub> x1	72,0	-	-	-	-	-	-	Neg.	25-50	Neg.	25-50	-	-
	48,0	-	-	-	-	-	-	-	0-25	Neg.	0-25	-	-
	24,0	-	-	-	-	-	-	-	0-25	-	0-25	-	-
B <sub>f</sub> x2	200,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Neg.	25-50	Neg.	25-50
	130,0	-	-	-	-	-	-	-	-	Neg.	0-25	Neg.	0-25
	65,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0-25	-	0-25
Qdo1	16,0	-	-	-	75-100	-	-	-	75-100	-	-	-	-
	8,0	-	-	Neg.	0-25	-	-	Neg.	75-100	-	-	-	-
	4,8	-	-	-	0-25	-	-	-	0-25	-	-	-	-
Qdo2	18,0	Neg.	75-100	Neg.	75-100	-	-	-	-	-	-	-	-
	9,0	Neg.	0-25	-	25-50	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Porcentaje de células teñidas con IP. <sup>b</sup> "-" indica que no se aplicó el ensayo correspondiente para esas condiciones (concentración-tiempo). <sup>c</sup> Representa un resultado de TUNEL negativo, es decir, un índice apoptótico igual o menor al del control negativo (2%). <sup>d</sup> Para este compuesto se trabaja con la cepa CL Brener.

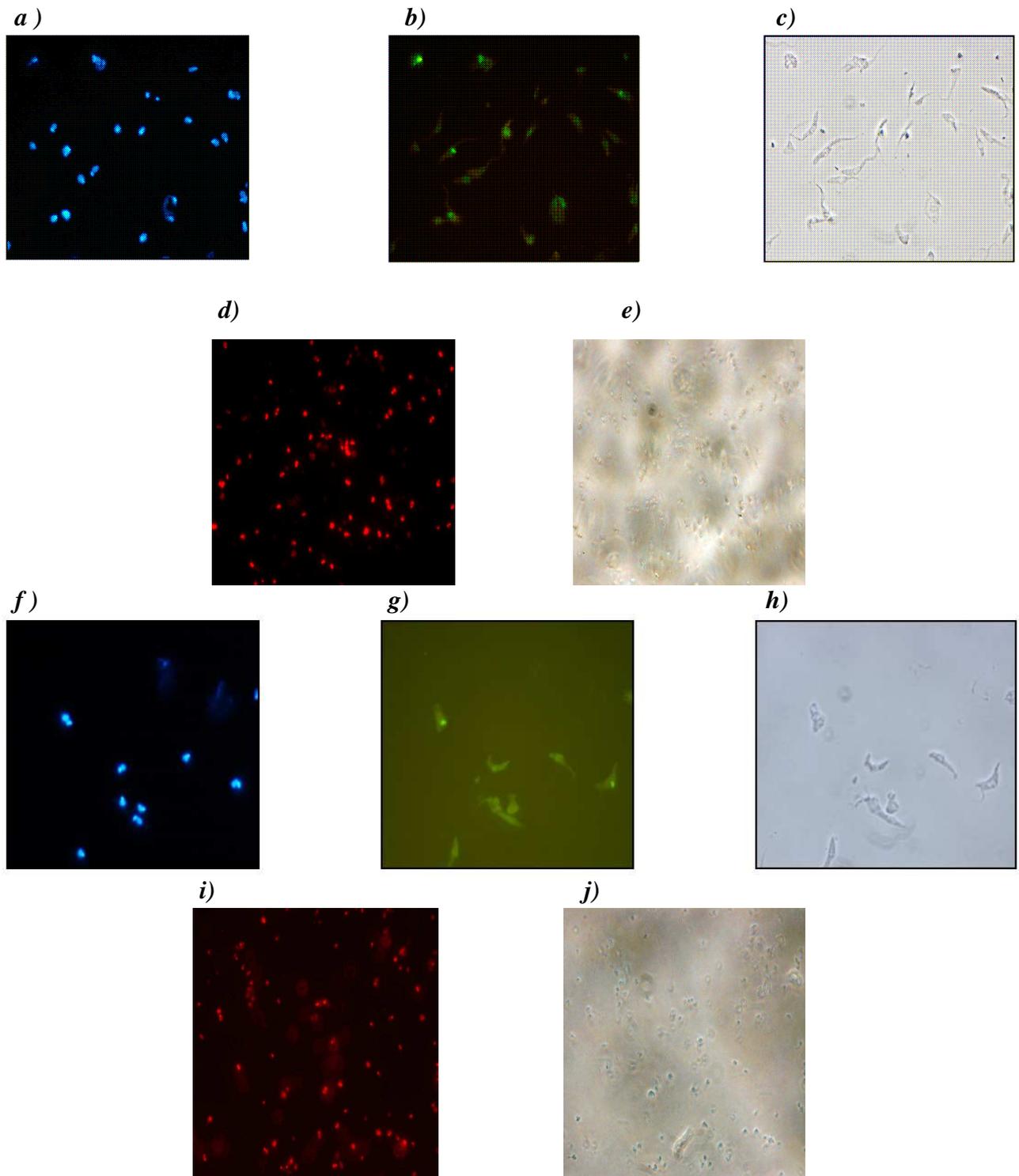
En todas las condiciones evaluadas, y para todos los compuestos, la técnica TUNEL es negativa (Fig. 16, Tabla 5), por lo que se puede concluir que el mecanismo de muerte de los parásitos no sería por apoptosis. En este caso se usa  $H_2O_2$  como compuesto de referencia para muerte por apoptosis de *T. cruzi*. Este no ha sido descrito en la literatura como promotor de apoptosis en *T. cruzi* aunque existían estudios previos del grupo del Dr. Galanti que lo postulaban. En este caso se confirmó su positividad. Se evidenció la completa superposición de las células marcadas con DAPI y la fluorescencia de la microscopía TUNEL que indica que todas las células no viables presentan TUNEL positivo (Fig. 16g-i). Esto permitió confirmar la robustez de los resultados negativos observados para todos los compuestos evaluados en el presente trabajo de tesis.

Observando la Figura 16 se puede notar que existe una superposición casi del 100 % entre la tinción con DAPI y con TUNEL, tiñéndose todo el ADN tanto núcleo como cinetoplasto. Sin embargo, en los otros casos (Fig. 16b y e) cuando el TUNEL es negativo, se puede ver algún cinetoplasto, pero no se observan núcleos teñidos.



*Fig. 16. Superior: Nf1, 48 h, 19,5  $\mu$ M. Aumento 1000  $\times$ . a) DAPI positivo, b) TUNEL negativo y c) contraste de Fase. Medio: Bfx1, 24 h, 72  $\mu$ M. Aumento 1000  $\times$ . d), e) y f) igual que en el caso anterior. Inferior: Control positivo para TUNEL ( $H_2O_2$ : 500  $\mu$ M, 30 min de incubación a 28  $^{\circ}$ C). Aumento 1000  $\times$ . g) DAPI positivo, h) TUNEL positivo, i) Contraste de Fase.*

Por otro lado, cabe destacar que en el caso de las quinoxalinas (Qdo1 y Qdo2) se observan en ciertas condiciones, de concentraciones y tiempos, entre 75 a 100 % de parásitos teñidos con IP, lo cual confirma muerte por necrosis (Fig. 17).



*Fig. 17. Superior: Qdo1, 24 h, 8,0  $\mu$ M. a) DAPI positivo, b) TUNEL negativo y c) contraste de fase correspondiente (aumento 1000  $\times$ ). d) IP positivo (75–100 %) y e) contraste de fase correspondiente (aumento 400  $\times$ ). Inferior: Qdo2, 3 h, 18,0  $\mu$ M. f) DAPI positivo, g) TUNEL negativo y h) contraste de fase correspondiente (aumento 1000  $\times$ ). d) IP positivo (75–100 %) y e) contraste de fase correspondiente (aumento 400  $\times$ ).*

Esta diferencia de comportamiento observado para ambas quinoxalinas, con respecto al resto de los compuestos evaluados, estaría indicando que los restantes productos (Nf1, Fx2, Fx3, Bfx1 y Bfx2) podrían estar promoviendo otro tipo de muerte celular, como podría ser autofagia. Este hecho por lo tanto fue estudiado con otras técnicas como MET y uso de un inhibidor de autofagia.

### 5.3. Estudio de la interacción de los compuestos con la membrana del eritrocito

A través de este estudio se pretende indagar como afectan los compuestos a las membranas celulares, si son capaces de generar algún tipo de daño, evaluando la integridad del eritrocito.

Para este estudio se utiliza el ensayo de hemólisis. Este modelo es una medida de la citotoxicidad de los compuestos sobre glóbulos rojos, es decir cuanto más tóxico el compuesto, mayor hemólisis.

También sirve para estudiar la interacción de los compuestos con la membrana del eritrocito, a mayor interacción, más se altera la membrana del eritrocito, más hemoglobina se libera, mayor es la necrosis. Los eritrocitos son un muy buen modelo celular para este estudio dada su accesibilidad, fácil manipulación, y que al lisarlos se libera hemoglobina fácilmente cuantificable [51,52].

Se determina la concentración de hemoglobina liberada, a las 24 h de tratamiento, determinando la absorbancia a 405 nm, sin necesidad de ninguna reacción previa [51]. Como control positivo de 100 % de hemólisis, luego de ensayar distintas alternativas, se decide emplear agua milli Q.

Se incluye adicionalmente en este ensayo anfotericina B [52] como control positivo de lisis a una concentración de apenas 1,5  $\mu\text{M}$ . Este compuesto es un polieno macrólido que por sus características fisicoquímicas se inserta en la membrana del eritrocito generando un aumento de la permeabilidad de la misma.

Los resultados de porcentaje de hemólisis se presentan en la Tabla 6.

Se han ensayado concentraciones muy superiores a las  $\text{IC}_{50}$  para cada uno de los compuestos objeto de este estudio. Las concentraciones evaluadas corresponden a concentraciones que no causan daño mecánico del eritrocito como resultado de la precipitación del producto en las condiciones de este modelo.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Porcentaje de Lisis</b>
<b>Nfx</b>	200,0	0,0 $\pm$ 8,1
<b>Nf1</b>	100,0	0,0 $\pm$ 5,5
<b>Fx1</b>	300,0	0,0 $\pm$ 0,8
<b>Fx2</b>	200,0	0,0 $\pm$ 6,0
<b>Fx3</b>	150,0	0,0 $\pm$ 1,7
<b>Bfx1</b>	200,0	0,0 $\pm$ 1,0
<b>Bfx2</b>	200,0	0,0 $\pm$ 4,3
<b>Qdo1</b>	100,0	0,0 $\pm$ 4,0
<b>Qdo2</b>	150,0	0,0 $\pm$ 1,6
<b>Anfotericina B</b>	1,5	50,0 $\pm$ 2,6

Para todos los compuestos en estudio no se observa liberación de hemoglobina, es decir, por este modelo, no se observa pérdida de integridad de la membrana.

#### 5.4. Identificación del tipo de muerte celular en *T. cruzi* por $^1\text{H}$ -RMN

La aplicación de esta técnica se basa en el principio mencionado en el apartado 1.3 de la presente tesis.

Esta técnica no ha sido previamente utilizada para determinar el tipo de muerte en parásitos, por lo que primeramente en este trabajo de tesis se trató de implementarla, basándose en los procedimientos descritos para células mamíferas [17].

Así, los parásitos se tratan con los productos de interés a concentraciones definidas y se incuban durante diferentes tiempos de acuerdo al estudio de muerte realizado por técnicas convencionales, para asegurarse que se encuentra en condiciones de muerte apoptótica o necrótica. Después de la incubación se separan las células de *T. cruzi* del medio de cultivo con las que se llevará a cabo el estudio de los ML por  $^1\text{H}$ -RMN. Como forma de asegurarse que en la suspensión en PBS de los parásitos sin tratar, denominado “Control parásitos ML”, no se detectan señales de metabolitos solubles provenientes del medio de cultivo es que se realizan tres lavados de los mismos con dicha solución tampón. Cabe mencionar que aun en estas condiciones se detectan, en algunos experimentos, señales que pueden ser asignadas a los metabolitos Ala y EtOH. El origen de estas señales se confirma por comparación con espectros realizados en PBS al cual se le agregan los metabolitos de interés y por comparación con un espectro obtenido a partir de medio de cultivo de parásitos no tratados denominado, “Control parásitos metabolitos” (Fig. 18a). En la Fig. 18b se muestran las señales detectadas, picos finos, que pueden corresponder a estos metabolitos solubles que aparecen en el “Control parásitos ML”.

En el espectro que se muestra en la Fig. 18b se identifican las señales provenientes de los ML las cuales son anchas, y que se han identificado como correspondientes a los agrupamientos  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  de las cadenas alquílicas de los lípidos. Además, es posible identificar el sistema  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  proveniente de la colina, posiblemente constituyente de la fosfatidilcolina de membrana [17,23]. Estas mismas señales son las que se consideran en el caso de células mamíferas para el estudio de tipo de muerte por RMN lo que implica que también las mismas pueden ser utilizadas para el estudio en parásitos. Particularmente en este trabajo de tesis para identificar el tipo de muerte celular en *T. cruzi*.

Como forma de cuantificar estos protones se tienen en cuenta en el procesamiento de los espectros los rangos de integración con la precaución de evitar integrar señales adyacentes que no correspondan. Los rangos de integración se indican en la Tabla 7 y en la Fig. 19, donde se muestra un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de una suspensión en PBS de parásitos no tratados, “Control parásitos ML”. La señal correspondiente a los protones *N*-metílicos de la colina, según la literatura, resuenan en la región próxima a 3,2 ppm. En esta región se observa una señal ancha, pero por encima de ésta también se detectan picos angostos los cuales podrían corresponder a metabolitos. Por este motivo no se integra esta región, pero se observa la variación de su perfil respecto al “Control parásitos ML”.

<b>Señal</b>	<b>Rango de integración (ppm)</b>	<b><math>\delta^a</math></b>
<b><math>\text{CH}_2</math></b>	1,20 - 1,35	1,27
<b><math>\text{CH}_3</math></b>	0,80 - 0,90	0,87
<i><sup>a</sup> Los valores de <math>\delta</math> presentan un error de <math>\pm 0,02</math></i>		

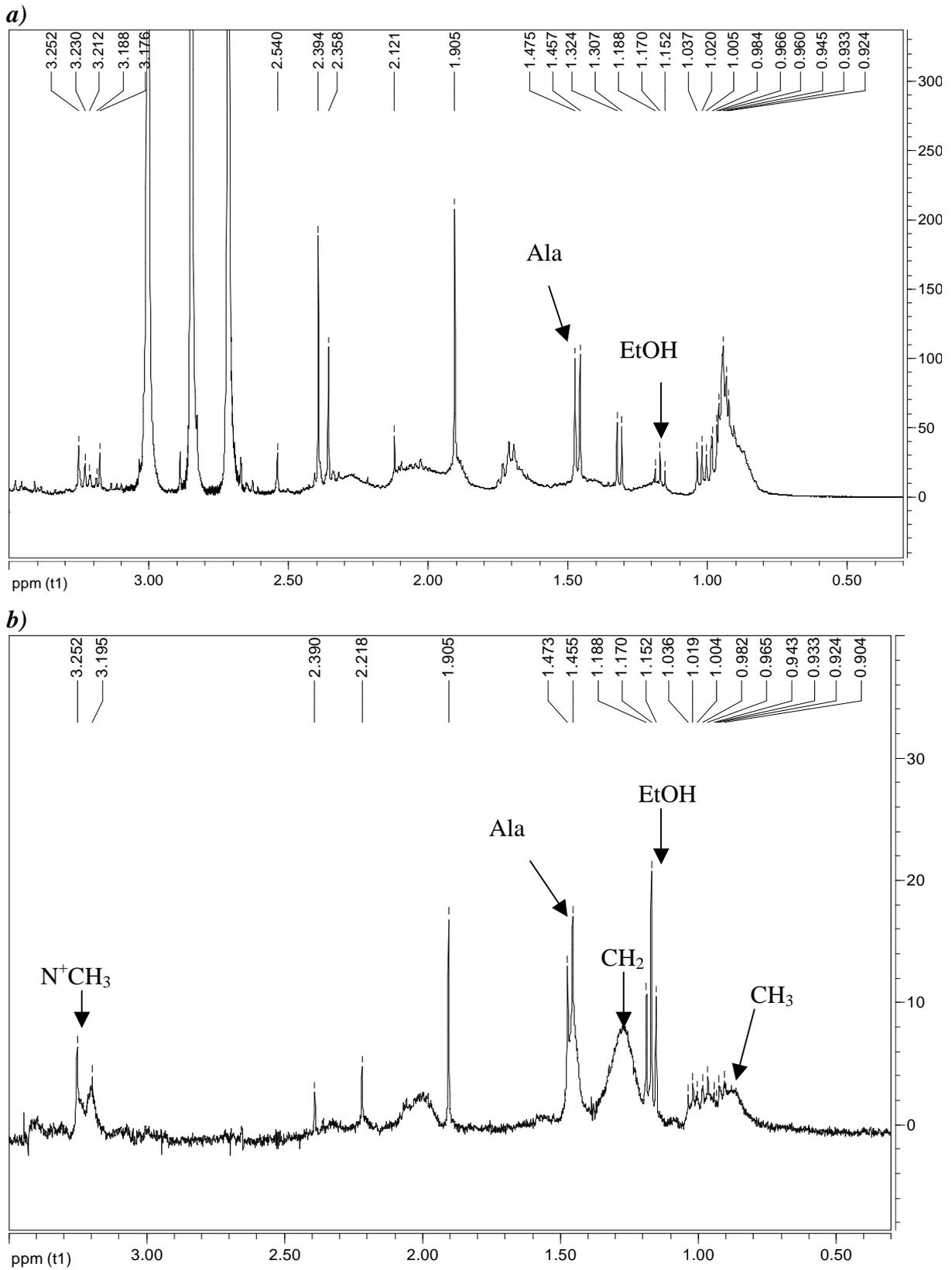


Fig. 18. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $22,16^\circ\text{C}$ ) de a) “Control parásitos metabolitos” (sobrenadante del medio de cultivo donde se cultivó *T. cruzi*) y b) “Control parásitos ML” (parásito entero y sano suspendido en  $\text{D}_2\text{O}$ ).

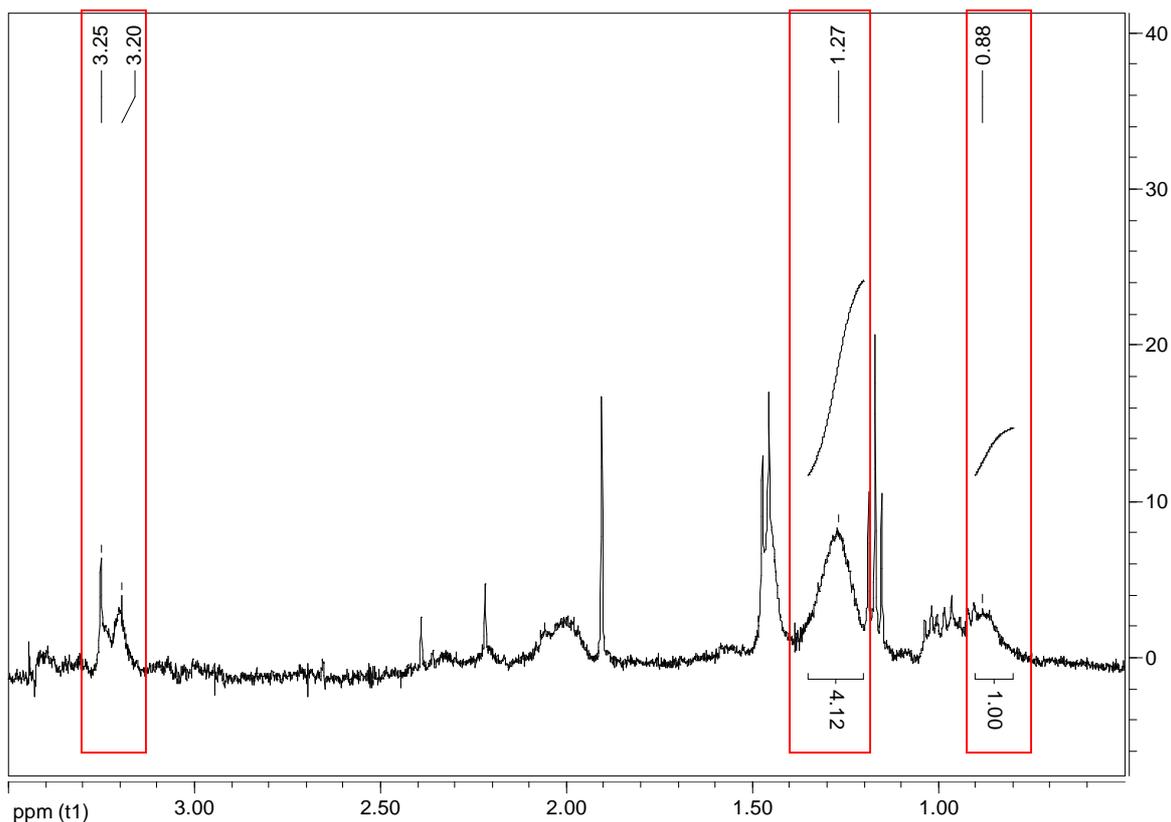


Fig. 19. Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  "Control parásitos ML" ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $22,16^\circ\text{C}$ ). En los recuadros rojos se muestran las zonas tenidas en cuenta en el estudio de ML.

#### 5.4.1. Induciendo apoptosis con $\text{H}_2\text{O}_2$

Dado que para ninguno de los compuestos estudiados, en las condiciones ensayadas de tiempo y dosis, fue posible observar muerte por apoptosis y como forma de estandarizar la técnica de  $^1\text{H-RMN}$  se utilizó un reactivo económico,  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En la presente tesis se confirmó que el mismo promueve apoptosis en *T. cruzi* en ciertas condiciones de trabajo (TUNEL positivo, apartado 5.2., Fig. 16).

Como primera consideración y a modo de conocer la actividad antiproliferativa de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sobre la cepa Y de *T. cruzi* se determina la  $\text{IC}_{50}$  siendo esta de  $2895 \pm 255 \mu\text{M}$ .

Los experimentos de inducción de apoptosis se realizaron aumentando paulatinamente la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 400 a 80000  $\mu\text{M}$  y los tiempos de 0,5 a 2,5 h. La selección de los mismos se realizó considerando los antecedentes [16,22a] así como la morfología del parásito controlada al microscopio óptico. Además, las concentraciones están relacionadas con las correspondientes al estudio de muerte celular por técnica de TUNEL (apartado 5.2), afectadas por un factor de 25 que resulta de la normalización por el número de parásitos en cada ensayo. En la técnica TUNEL se consigue con  $\text{H}_2\text{O}_2$  un índice apoptótico de 100 % entre 200 a 500  $\mu\text{M}$  usando 6 millones de parásitos mientras que en los estudios del presente apartado se trabaja sobre 150 millones de parásitos, para obtener una adecuada relación señal/ruido en los espectros de  $^1\text{H-RMN}$ . Entonces las concentraciones de 400 a 80000  $\mu\text{M}$  de este ensayo se corresponden con dosis de 16 a 3200  $\mu\text{M}$  en el ensayo TUNEL. Por lo que el trabajar a la concentración de 8000  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  permite asegurar que se está en condiciones de inducción de apoptosis.

El tiempo más apropiado resultó ser de 2,5 h. Ver los resultados de microscopía óptica, a la concentración del ensayo (150 millones/ mL), en la Tabla 8.

Se puede mencionar que a las 2,5 h posterior al tratamiento, con 400 a 8000  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  los *T. cruzi* no se tiñen con AT, lo que indica la falta de permeabilización de la membrana, mientras que al tratarlos con 80000  $\mu\text{M}$  surgen células con ruptura de membrana lo que podría estar indicando comienzo de necrosis.

**Tabla 8. Resultados de microscopía óptica para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , cepa Y de *T. cruzi*.**

	Parásitos no teñidos con AT	Parásitos con morfología normal (forma y tamaño)	Parásitos con movilidad normal
Concentración ( $\mu\text{M}$ )/tiempo (h)	2,5	2,5	2,5
400			
800			
8000			
80000			

**Leyendas:**

	75 - 100 %
	50 - 75 %
	25 - 50 %
	0 - 25 %

Así, después del tratamiento, a diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y por 2,5 h, de *T. cruzi* se adquirieron los correspondientes espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de las células enteras suspendidas en PBS (Fig. 20). Del procesamiento de los espectros se obtuvieron las integraciones de los metilos y metilenos de los ML. Los datos que se muestran en la Tabla 9 son el resultado del cociente de la relación de integraciones  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  en cada experimento con tratamiento y sin tratamiento. Se realiza en cada caso el cociente con la respectiva relación de “Control parásitos ML” para normalizar respecto a la situación inicial de los ML de la población parasitaria de trabajo (ver apartado siguiente, 5.4.2.).

**Tabla 9. Cuantificación de ML por  $^1\text{H}$ -RMN al tratar los parásitos con concentraciones variables de  $\text{H}_2\text{O}_2$**

Concentración de $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{M}$ ) - 2,5 h	Cociente $\text{CH}_2/\text{CH}_3$
400	$0,99 \pm 0,04$
800	$1,01 \pm 0,05$
8000	$1,33 \pm 0,04^{**}$
80000	$1,00 \pm 0,06$
Control parásitos ML	$1,00 \pm 0,04$

\*\*  $p < 0,0002$  ( $n = 3$ , comparado con “Control parásitos ML”, test t-Student)

A la concentración de 8000  $\mu\text{M}$  se observa un significativo incremento de la relación  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  mientras que a concentraciones menores, condiciones no necróticas, 400 y 800  $\mu\text{M}$ , o a la concentración mayor, condición necrótica, 80000  $\mu\text{M}$ , no se obtiene una diferencia estadísticamente significativa con respecto al “Control parásitos ML”.

En la figura 20 se muestran ejemplos de los perfiles  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  obtenidos en algunos de los experimentos realizados. Observar como varían las relaciones de las integraciones  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  respecto al "Control parásitos ML", este cociente se hace máximo para los parásitos tratados con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $8000 \mu\text{M}$  y se normaliza para los parásitos tratados a  $80000 \mu\text{M}$ . Estos resultados concuerdan con los obtenidos para células mamíferas en donde la apoptosis se correlaciona con un aumento de la relación  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  de los ML y que en el caso de necrosis dicha relación se mantiene constante [17a,23].

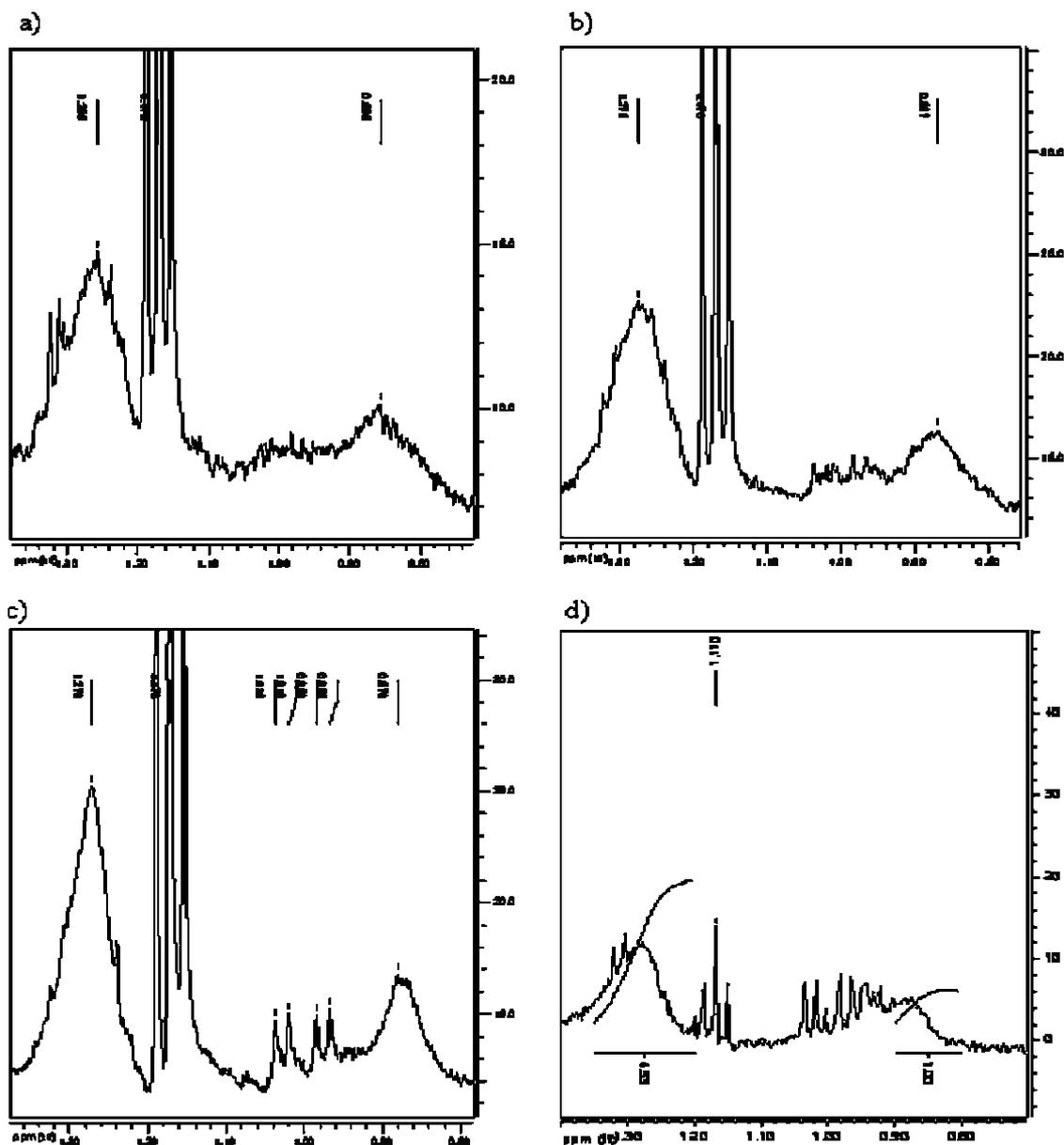


Fig. 20. Región del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $22,16 \text{ }^\circ\text{C}$ ) donde se muestran los ML de a) "Control parásitos ML", b) Tratado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $400 \mu\text{M}$ , c) Tratado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $8000 \mu\text{M}$ , d) Tratado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $80000 \mu\text{M}$ .

Como ya se mencionó anteriormente (apartado 1.3, Introducción) otro dato que podría ser relevante en condiciones de apoptosis está marcado por el cambio de PC a lisoPC (Fig. 21a). Este hecho podría evidenciarse por  $^1\text{H}$ -RMN teniendo en consideración las señales

N-metílicas próximas a 3,2 ppm [23]. En este sentido (Fig. 21b-d) se aprecia como varía el perfil de la región de la colina con el aumento de la concentración de  $H_2O_2$  con la cual se tratan los parásitos. Al aumentar la concentración de  $H_2O_2$ , la señal ancha se transforma en tres picos bien definidos, cuyas intensidades van en aumento.

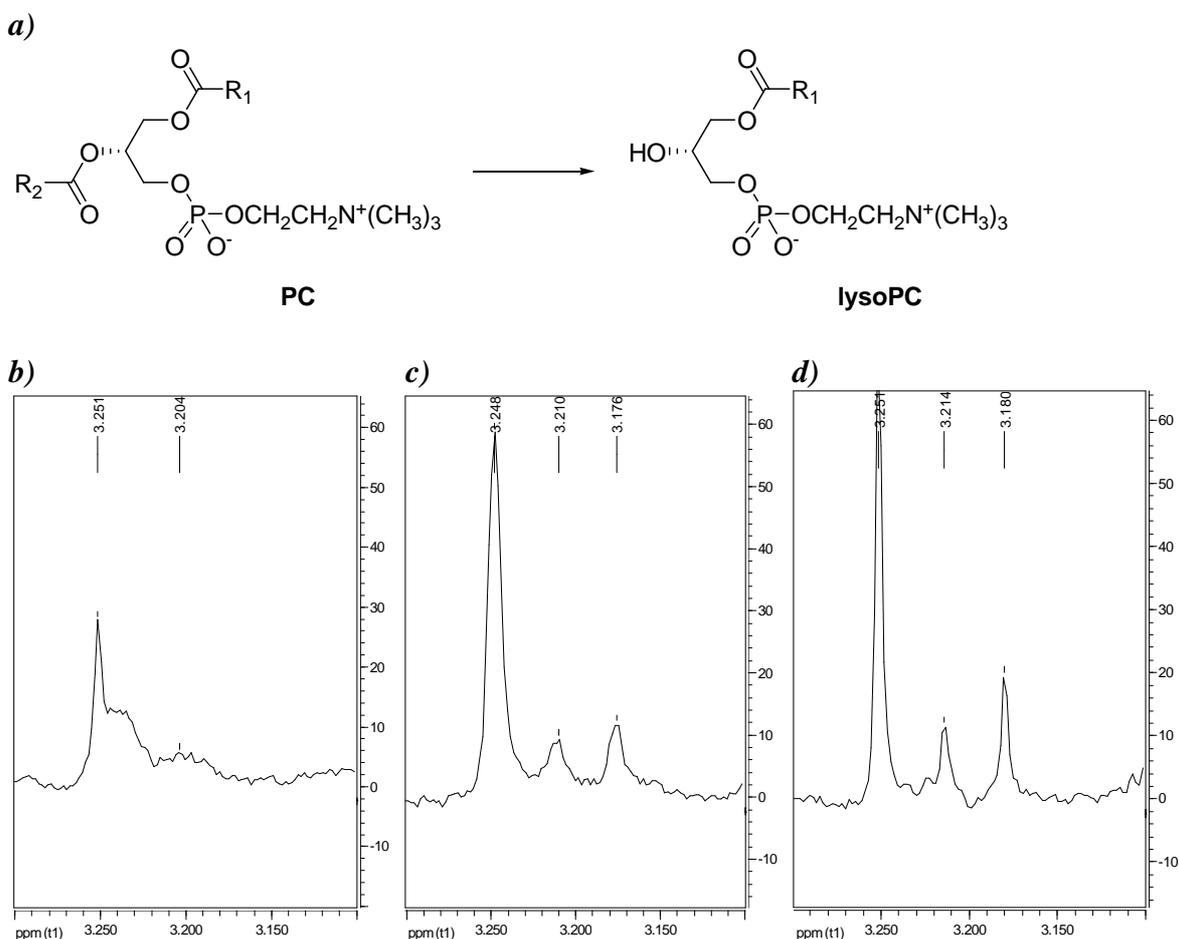


Fig. 21. Región del espectro de  $^1H$ -RMN ( $D_2O$ ,  $22,16^\circ C$ ) donde se observa la variación del perfil de la colina, a) Conversión de PC a LysoPC, b) "Control parásitos ML", c) Tratado con  $H_2O_2$  a  $8000\ \mu M$ , d) Tratado con  $H_2O_2$  a  $80000\ \mu M$ .

#### 5.4.2. Induciendo apoptosis por envejecimiento del cultivo de parásitos en medio axénico

Como se mencionara anteriormente ha sido descrito por el grupo de Galanti y colaboradores que las características apoptóticas de epimastigotes en medios de cultivo axénico se acentúan a medida que transcurren los días y principalmente en la fase estacionaria de crecimiento [11]. Por lo que se decide evaluar si utilizando la metodología desarrollada para el estudio de apoptosis por  $^1H$ -RMN es posible estudiar el efecto del transcurso del tiempo en cultivos axénicos de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y.

Como forma de evaluar las condiciones en que se encuentran los parásitos en los días de estudio se observa al microscopio óptico en cada condición de trabajo. Así, al día 4 de cultivo, los parásitos están en plena fase proliferativa ó de crecimiento exponencial y muestran características de vitalidad total. Al día 7, están ingresando en fase estacionaria y comienzan a perder movilidad. En el día 14, se encuentran en fase estacionaria siendo la pérdida de las características de vitalidad más evidentes (Tabla 10, observar como varía el número de parásitos).

**Tabla 10. Resultados de microscopía óptica para epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* creciendo en medio axénico.**

Día	Parásitos no teñidos con AT	Parásitos con morfología normal (forma y tamaño)	Parásitos con movilidad normal	Número de parásitos (millones/mL)
4				28 ± 3
7				50 ± 4
14				55 ± 6

Leyendas			
	75 - 100 %		25 - 50 %
	50 - 75 %		0 - 25 %

Interesantemente, al igual que lo que sucede en el caso del uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones que producen apoptosis, en la región CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> se aprecia un significativo aumento del cociente de las integraciones CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> (Fig. 22). Este hecho es dependiente del tiempo, lo que estaría indicando que los parásitos al día 14 tienen un mayor índice apoptótico. En la Tabla de 11 se muestra el estudio cuantitativo de las relaciones de las señales correspondientes a los CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> de los ML que se expresan respecto al cociente CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> del día 4.

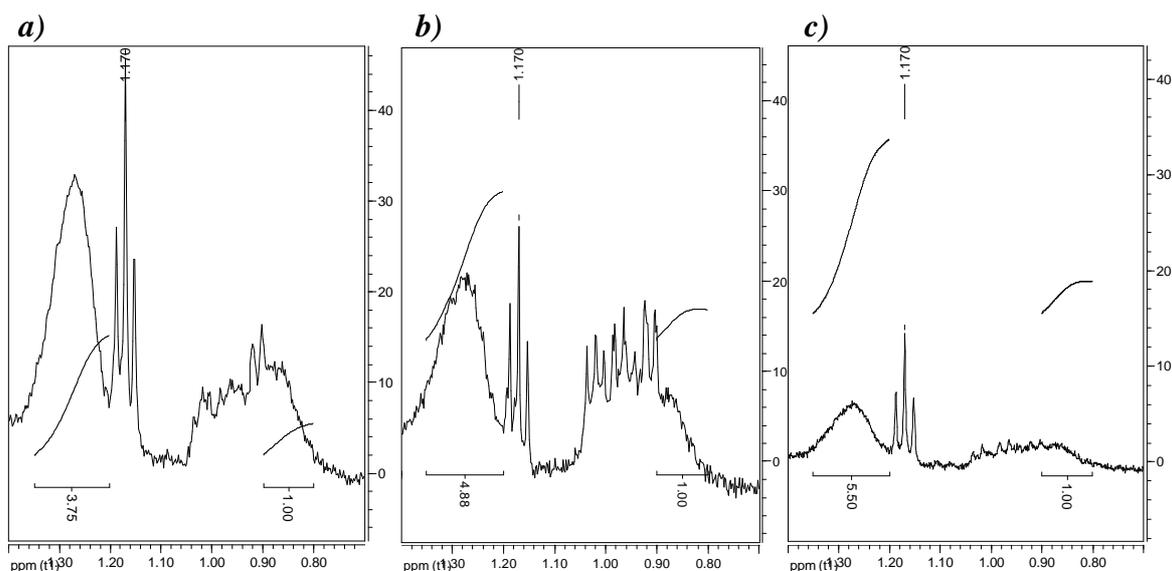


Fig. 22. Región del espectro de <sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O, 22,16 °C) donde se observan los ML de interés para estudios de muerte por apoptosis de parásitos mantenidos en medio de cultivo axénico a) Día 4, b) Día 7, c) Día 14 de cultivo.

**Tabla 11. Cuantificación de ML por <sup>1</sup>H-RMN con el transcurso del tiempo de cultivos de *T. cruzi*, cepa Y.**

Día de crecimiento	Cociente CH <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> respecto al día 4
4	1,00 ± 0,05
7	1,29 ± 0,07**
14	1,47 ± 0,05***

\*\* p < 0.005 (n = 3, con respecto al día 4, test t-Student)

\*\*\* p < 0.0005 (n = 3, con respecto al día 4, test t-Student)

Como es de esperar, al ingresar en fase estacionaria de crecimiento (día 7) se aprecia un incremento estadísticamente significativo del cociente  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  respecto al día 4 de crecimiento, que aumenta de forma significativa al aumentar los días de cultivo, que está en estrecha relación con que el hecho que el cultivo de 14 días ya se encuentra en su fase estacionaria, con un alto número de células en estado apoptótico. Por lo que de nuevo se corrobora la importancia de esta técnica *in vitro* rápida y sencilla para evidenciar el tipo de muerte celular por apoptosis.

En el caso de la región de colina, la disminución de la misma no es tan notoria, sino que al contrario parece aumentar (Fig. 23, comparar con Fig. 21).

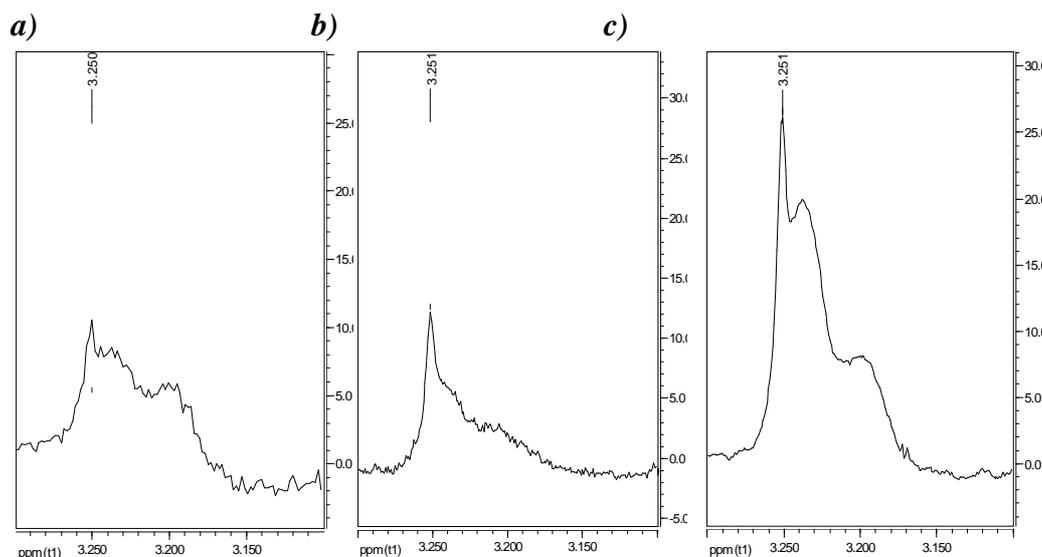


Fig. 23. Región del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $22,16^\circ\text{C}$ ) donde se muestra la señal de los  $\text{N}^+\text{CH}_3$  con el transcurso del tiempo de cultivo de *T. cruzi* a) Día 4, b) Día 7, c) Día 14.

#### 5.4.3. Induciendo necrosis por Nfx y Qdo2

Como ya se demostró, a partir de los estudios de tipo de muerte celular por TUNEL e IP, ninguno de los compuestos objeto de esta tesis es capaz de promover apoptosis en epimastigotes de *T. cruzi* en las condiciones de tiempo y dosis estudiados. Además, claramente Nfx (fármaco de referencia) y la quinoxalina Qdo2 causan muerte por necrosis a partir de cierto tiempo y a ciertas dosis.

Por ello, se decide utilizar estos compuestos, como agentes necróticos, para visualizar la aparición de los ML en *T. cruzi* por  $^1\text{H}$ -RMN. Así se trabaja siguiendo el protocolo previamente optimizado teniendo en cuenta los resultados de microscopía óptica sobre la cepa Y (Tabla 12) y los estudios por técnicas estándar (Tabla 5) se deciden evaluar las siguientes concentraciones: incubación por 48 h con Nfx a  $300\ \mu\text{M}$  e incubación por 2 h con Qdo2 a  $200\ \mu\text{M}$ .

El resultado cuantitativo de la evaluación de Nfx como fármaco que genera necrosis en parásitos de *T. cruzi* muestra que existe una relación  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  próxima a la unidad (Tabla 13) entre “Control parásitos ML” y parásitos tratados (Fig. 24a y b). Interesantemente si se observa la región próxima a 3,2 ppm donde aparece la colina se puede observar en este caso la desaparición de la señal de la misma cuando se comparan los espectros obtenidos a partir de la suspensión de los parásitos tratados con el “Control parásitos ML”. Este

desaparición podría deberse a la transformación total de la PC en el proceso de necrosis (Fig. 24c y d).

**Tabla 12. Resultados de microscopía óptica para Nfx y Qdo2, cepa Y de T. cruzi.**

	Parásitos no teñidos con AT	Parásitos con morfología normal (forma y tamaño)	Parásitos con movilidad normal
Concentración de Nfx ( $\mu\text{M}$ )/tiempo (h)	48	48	48
300			
Concentración de Qdo2 ( $\mu\text{M}$ )/tiempo (h)	2,0	2,0	2,0
200			

Leyendas			
	75 - 100 %		25 - 50 %
	50 - 75 %		0 - 25 %

**Tabla 13. Cuantificación de ML por  $^1\text{H}$ -RMN epimastigotes de T. cruzi, cepa Y, tratados con Nfx**

Concentración de Nfx ( $\mu\text{M}$ ) - 48 h	Cociente $\text{CH}_2/\text{CH}_3$
300	$0,98 \pm 0,05$

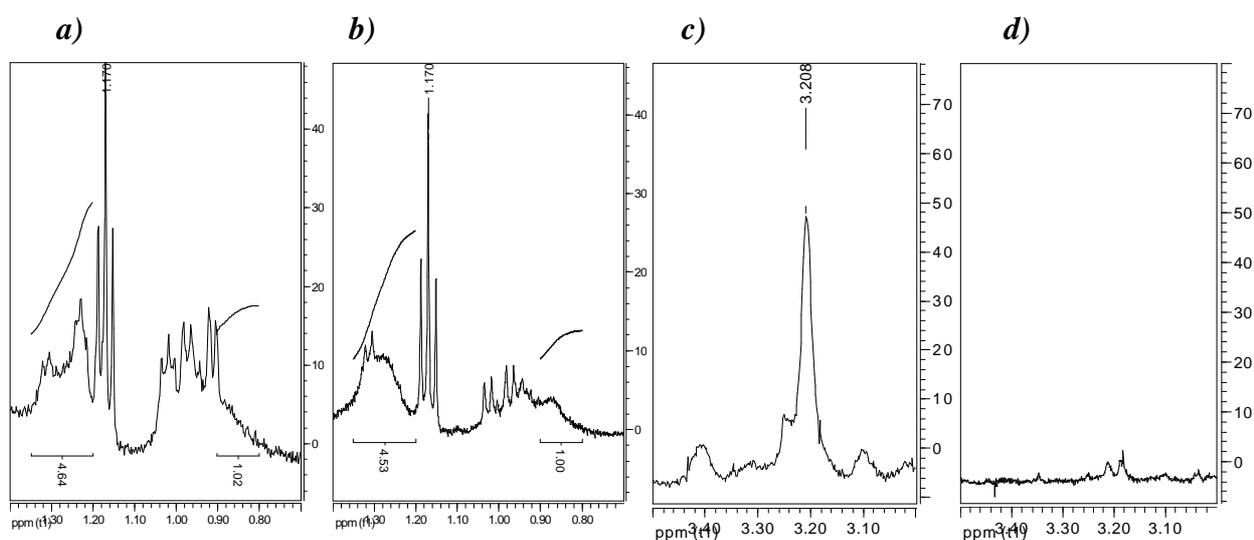


Fig. 24. Región del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $22,16^\circ\text{C}$ ) a) “Control parásitos ML” región  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ , b) tratado con Nfx región  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ , c) “Control parásitos ML” región colina, d) tratado con Nfx región colina.

En el caso que se emplea la quinoxalina Qdo2 se produce una significativa disminución de la señal correspondiente a los protones metilénicos con relación a los metílicos lo que se muestra en la Fig. 25 a y b. Esta disminución se determina cuantitativamente obteniéndose una relación de  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  de  $0,70 \pm 0,02$  lo que está mostrando en términos cuantitativos la pérdida de ML en la membrana celular. Con respecto a la señal de colina, el otro marcador estudiado, al igual que lo que sucede con Nfx se observa una disminución de la señal en 3,2 ppm (Fig. 25).

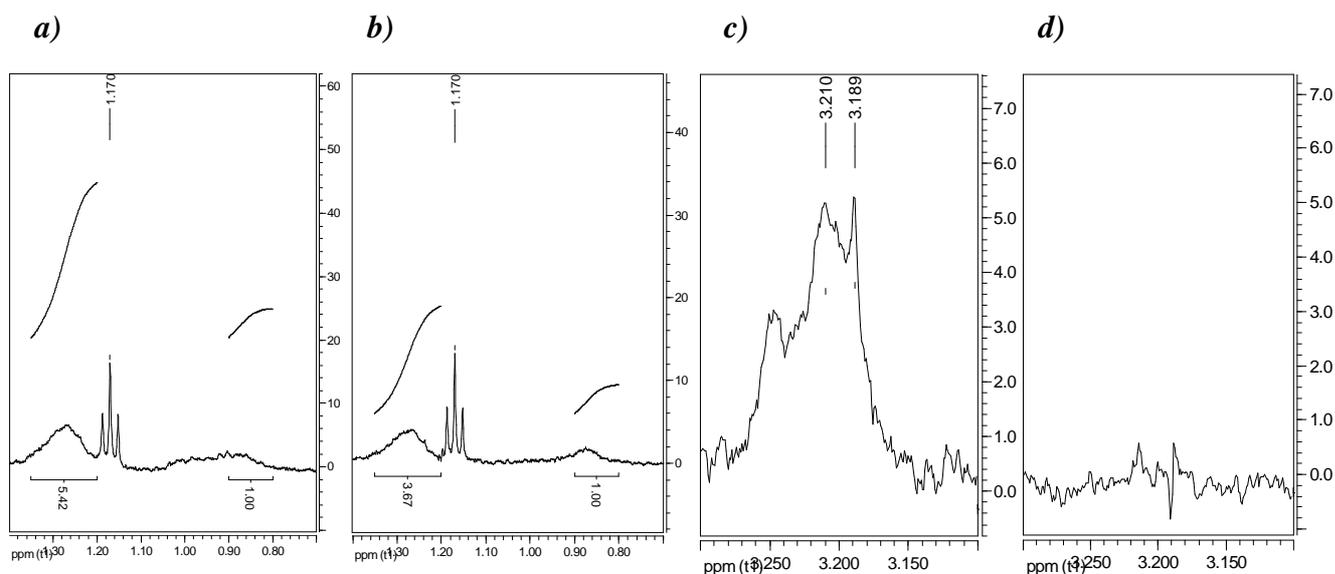


Fig. 25. Región del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $22, 16^\circ\text{C}$ ) a) “Control parásitos ML” región  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ , b) tratado con Qdo2 región  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ , c) “Control parásitos ML” región colina, d) tratado con Qdo2 región colina.

## 5.5. Análisis ultraestructural (MET)

La microscopía de transmisión electrónica ha sido ampliamente utilizada como forma de caracterizar estructuras intracelulares que dan cuenta, por ejemplo, de procesos autofágicos, como por ejemplo la aparición de vesículas citosólicas [18a,19,20a].

Como ya se mencionó anteriormente, por técnicas convencionales de determinación de tipo de muerte celular, ninguno de los compuestos estudiados en este proyecto de tesis de maestría mostró inducción de apoptosis en *T. cruzi*. Por otro lado, se ha demostrado por técnicas convencionales que ambas quinoxalinas Qdo1 y Qdo2 (y por RMN para esta última), en las condiciones estudiadas en este proyecto, inducen necrosis en *T. cruzi*. Sin embargo, para el resto de los compuestos Nf1, Fx2, Fx3, Bfx1, en las condiciones ensayadas, no fue posible identificar el tipo de muerte celular. Curiosamente en el estudio de microscopía óptica se observó que en el tratamiento de *T. cruzi* con tres de estos productos, Nf1, Fx3 y Bfx1, se generaban vacuolas citoplasmáticas de importancia, mientras los parásitos conservaban una normal movilidad. Este hecho, lleva a estudiar si se puede estar ante un proceso de autofagia.

Por lo que, se propuso como objetivo observar en detalle la ultraestructura de los parásitos tratados con los compuestos que producen vacuolas citoplasmáticas visibles en el microscopio óptico. Para ello se trabajó a concentraciones en que por microscopía óptica se observaban vacuolas, siendo para Nf1  $13,0\ \mu\text{M}$  en cepa Y, para Fx3  $45,0\ \mu\text{M}$  en cepa Y y para Bfx1  $65,0\ \mu\text{M}$  en cepa Tulahuen 2, incubando en todos los casos durante 24 h.

Como forma de reconocer en las condiciones del ensayo la ultraestructura de los *T. cruzi* normales a los cuales se denomina “Control parásitos MET”, se realiza la MET de estos. Por otra parte para evaluar la ultraestructura de una situación de reconocido perfil autofágico en *T. cruzi* se utiliza un tratamiento sólo con PBS [19] como se indica el apartado 3.2.5. A esta preparación de parásitos tratados con PBS se la denomina “Control autofagia”. La comparación macroscópica de ambos controles muestra un *pellet* de menor tamaño para el “Control autofagia” respecto al “Control parásitos MET”, lo que estaría indicando que ha existido pérdida de masa parasitaria. Con respecto a la observación por

microscopía óptica se aprecia claramente que las células del “Control autofagia” son más delgadas, luego de 24 h su movilidad decrece entre 0 y 25 % y no tiñen con AT. Es de destacar que por microscopía óptica no se observan vesículas de tamaño importante en el citoplasma del parásito, como ocurre en el caso de Nf1, Fx3 y Bfx1.

En cuanto al estudio MET de ambos tipos de controles se pueden hacer una serie de consideraciones que se muestran en comparación en las Fig. 26 y 27.

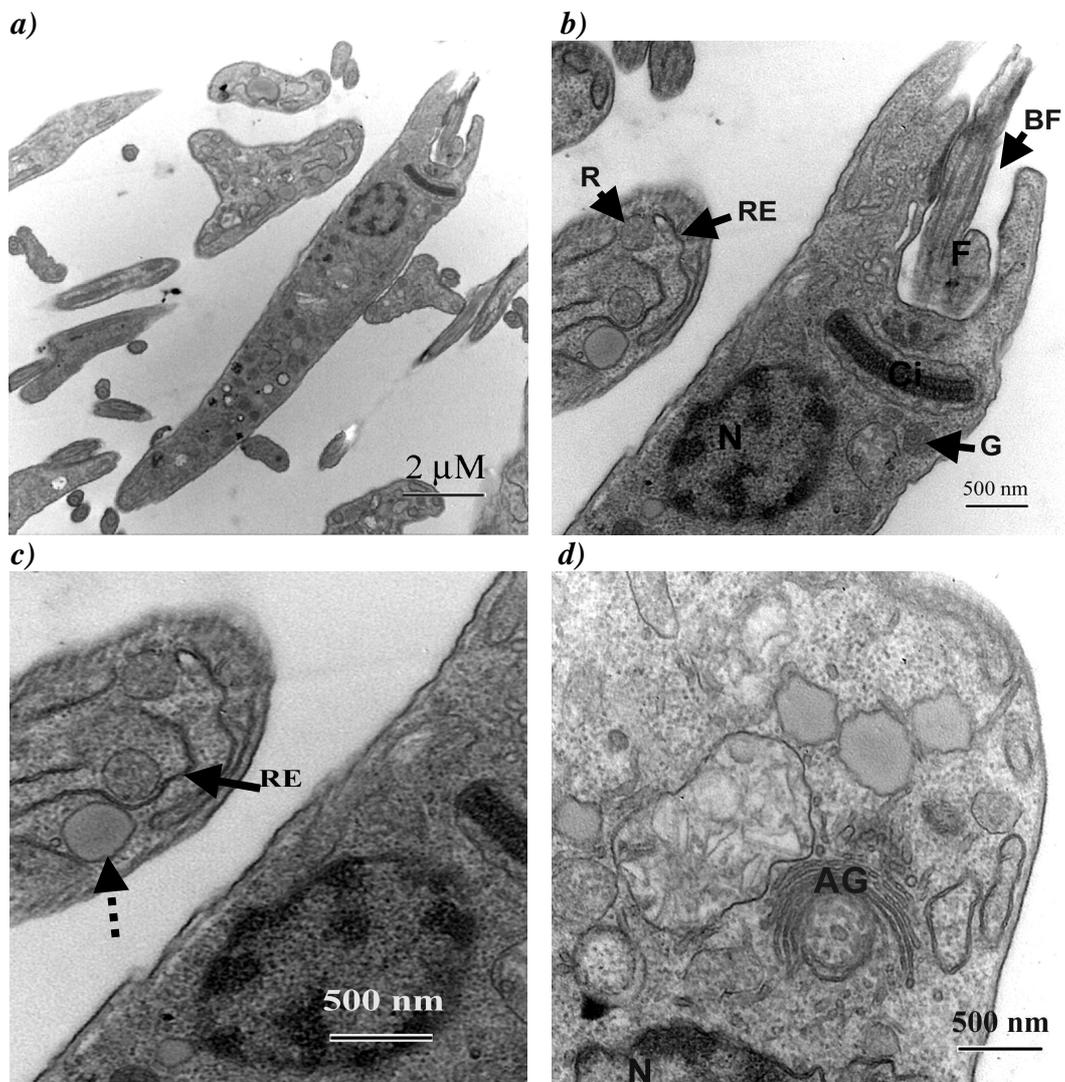


Fig. 26. MET del “Control parásitos MET”, a) 10000  $\times$ , b) y c) aumento de a): 30000  $\times$ , d) 40000  $\times$ . En b), c) y d) se indican las estructuras intracelulares. En c) se destaca con flecha punteada un posible CP (cuerpo lipídico) próximo al RE (retículo endoplasmático). AG: aparato de Golgi, BF: bosillo flagelar, Ci: cinetoplasto, F: flagelo, G: glicosoma, N: núcleo, R: reservosoma.

En la Fig. 26 se muestra la ultraestructura de *T. cruzi* en el “Control parásitos MET”, donde además de las estructuras celulares típicas de este tipo de tripanosomatídeos, como ser flagelo, cinetoplasto, glicosoma, reservosoma, presenta las estructuras comunes a todas las células eucariotas. Por otro lado, se puede observar como característica destacable una vesícula lipídica citosólica. Este puede ser un cuerpo lipídico, originado quizás a partir del

retículo endoplasmático ubicado próximo al mismo [24]. Aunque por otro lado, este tipo de vesículas suelen estar presentes en epimastigotes de *T. cruzi* por la inclusión de colesterol del medio de cultivo del parásito [18a]. Estos tipo de estructuras puede dar origen a las señales de ML mencionadas en el apartado 1.3.

En la Fig. 27 se muestran las microfotografías de epimastigotes de *T. cruzi* sometidos a tratamiento con PBS, inductor de autofagia. Lo más destacado en este estudio, control positivo de autofagia, es la presencia de una gran variedad de vesículas, de las cuales se pueden destacar autofagosomas, estructuras indicativas de autofagia. Estas estructuras presentan como características principales y como se observa claramente en la microfotografía, una doble membrana con un contenido de matriz citosólica más bien heterogéneo, tal como se describe en la literatura [18a,20a].

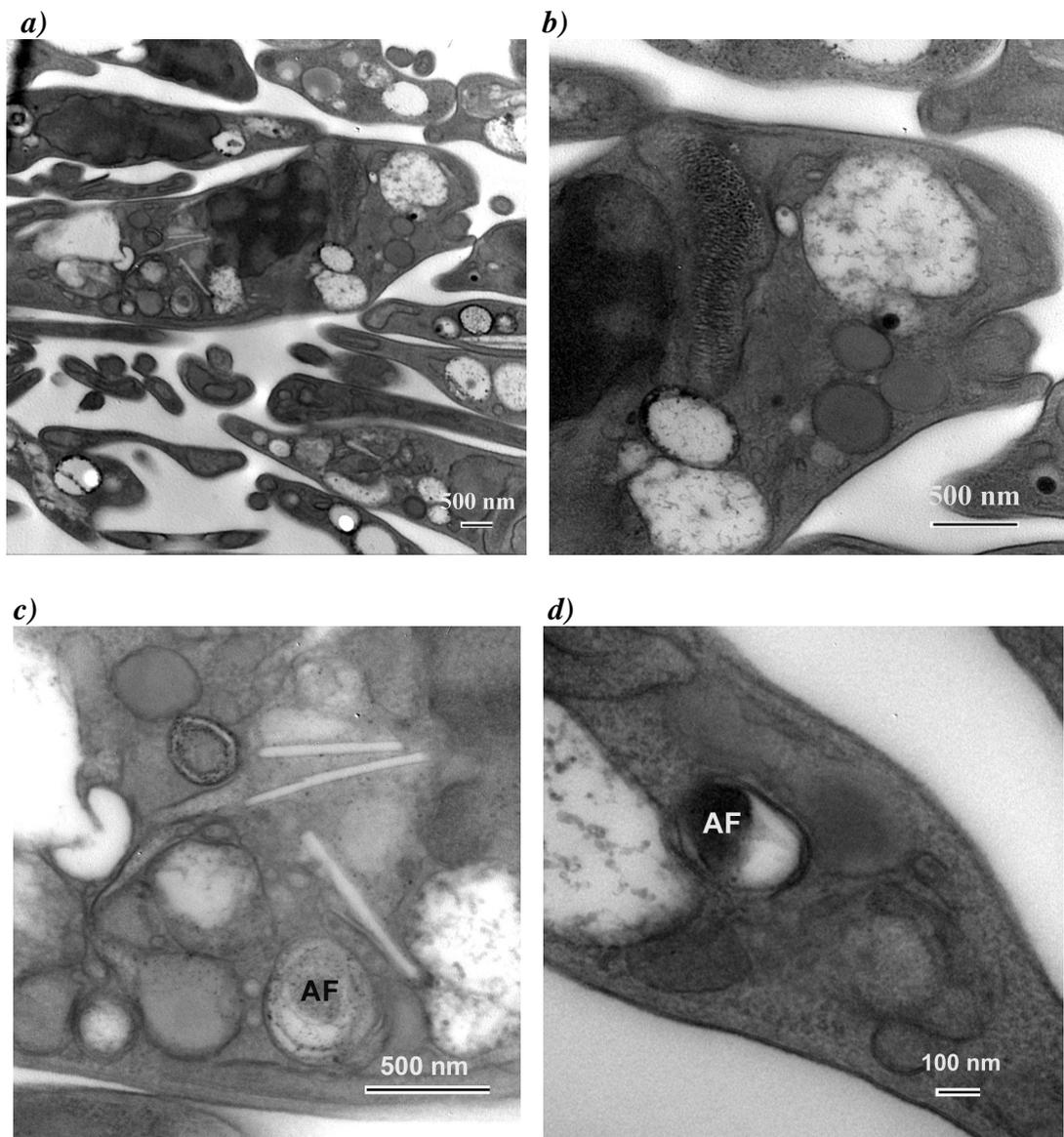
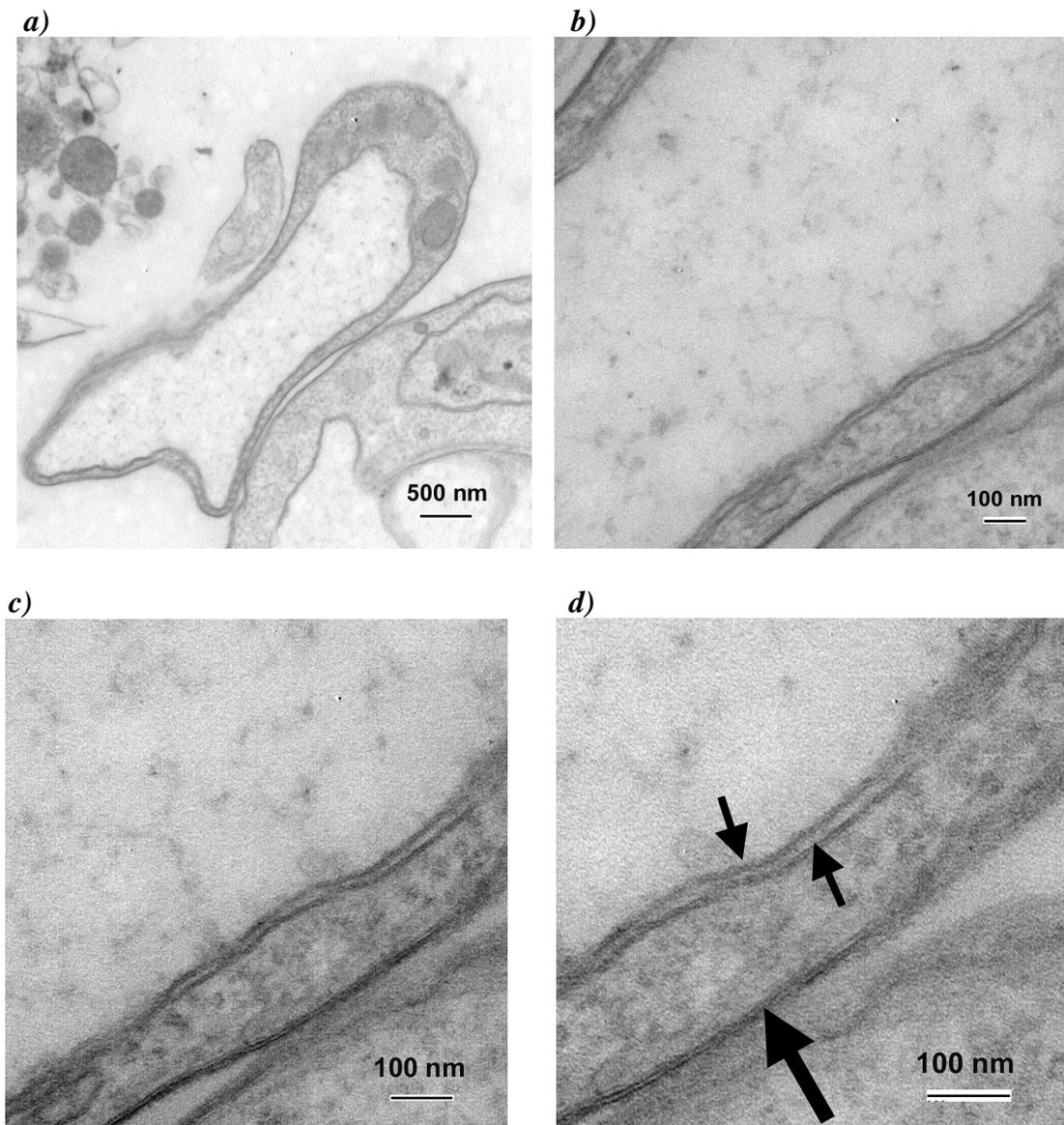


Fig. 27. MET del "Control autofagia", a) 15000  $\times$ , b) aumento de a): 40000  $\times$ , c) 60000  $\times$ , d) 100000  $\times$ . AF: autofagosomas (en c) y d))

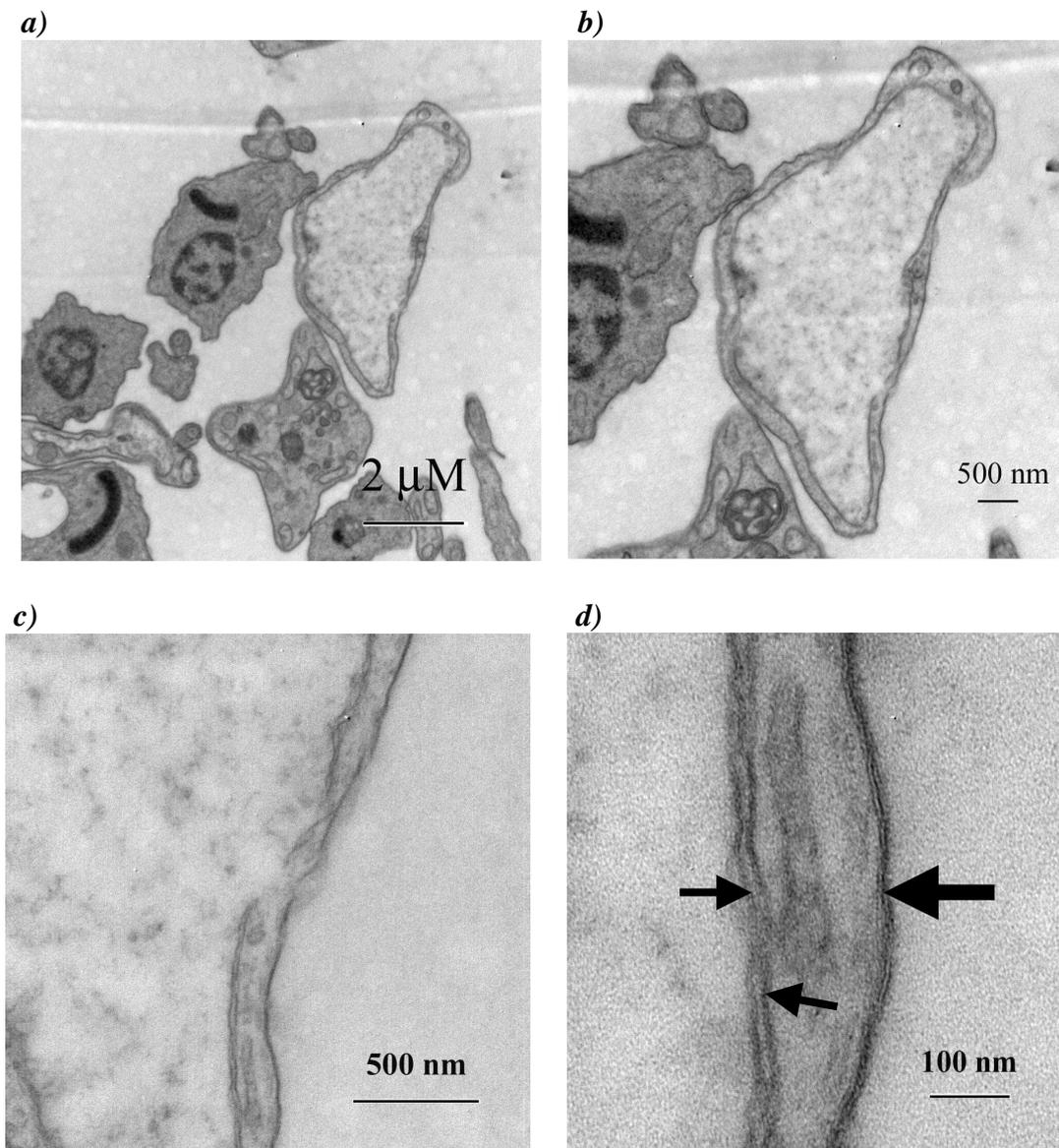
Como ya se mencionó, al comienzo de este apartado, se realizó el mismo estudio con los tres compuestos que presentan la capacidad de producir vacuolas en *T. cruzi*. En las Fig. 28-30 respectivamente se muestran las microfotografías de los productos Nf1, Fx3 y Bfx1.



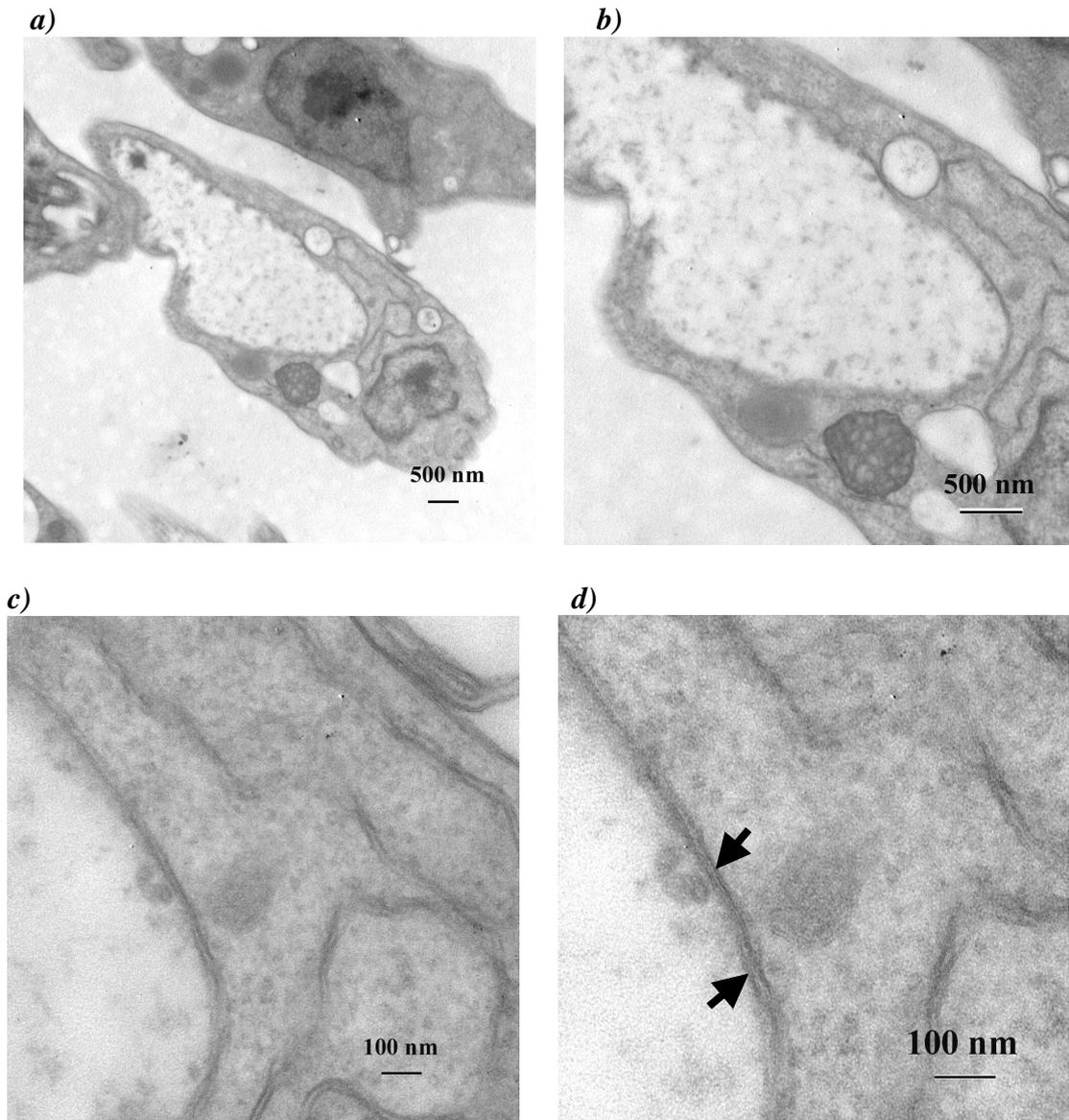
*Fig. 28. MET de Nf1: a) 25000  $\times$ , b) aumento de a): 100000  $\times$ , c) aumento de b): 150000  $\times$ , d) aumento de c): 200000  $\times$ . En d) se observa la pared de la vesícula (indicada con dos flechas cortas y angostas) y se la compara con la membrana plasmática de la célula (indicada con una flecha más larga y ancha). La pared de la vesícula muestra una doble membrana.*

Como se observa los parásitos cambian importantemente, su forma, se redondean y el contenido citosólico es hace poco visible en presencia de las vacuolas (Fig. 28a, 29a y 30a). Se aprecia que estas vacuolas en el caso de los tres tratamientos evaluados tienen una morfología similar, su forma es irregular y pueden adquirir un diámetro de aproximadamente 6 micras desplazando todas las estructuras celulares hacia la membrana

plasmática. Su contenido es electron-lúcido, finamente granular y homogéneo. Además, presentan la peculiaridad de poseer una doble membrana (Fig. 28d, 29d y 30d). En el caso de algunas microfotografías del tratamiento con Bfx1 se pudo observar, además, estructuras que corresponderían a retículo endoplasmático en las proximidades de la vesícula (Fig. 30b). Estas características son similares a las de otras vesículas tipo-autofagosoma descritas en la literatura para tripanosomatídeos (apartado 1.2.2.).



*Fig. 29. MET de Fx3: a) 12000 ×, b) aumento de a): 20000 ×, c) aumento de b): 60000 ×, d) aumento de c): 200000 ×. En d) se observa la pared de la vesícula (indicada con dos flechas cortas y angostas) y se la compara con la membrana plasmática de la célula (indicada con una flecha más larga y ancha)*



*Fig. 30. MET de Bfx1: a) 15000 ×, b) aumento de a): 30000 ×, c) aumento de b) 100000 ×, d) aumento de c): 150000 ×. En d) se observa la pared de la vesícula señalada con dos flechas. RE: retículo endoplasmático ((en b))*

## 5.6. Estudios con inhibidor del proceso de autofagia: 3-MA.

Como otra forma de estudiar si los tres productos que producen las vacuolas (Nf1, Fx3, Bfx1) producen autofagia en epimastigotes de *T. cruzi* sometido a los mismos, se tratan los parásitos con un inhibidor de la enzima PI3K, la cual es esencial para el correcto desarrollo del proceso de autofagia (18b).

Los tres compuestos de interés se evalúan en las mismas condiciones que en el apartado anterior como forma de asegurar que las condiciones son idénticas a aquellas donde se identificaron posibles vesículas autofágicas.

La evaluación del proceso de inhibición de autofagia, de acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 14), no muestran cambios significativos en los parámetros evaluados que se tomaron como referencia (integridad de membrana, morfología celular y movilidad), entre los parásitos tratados con el compuesto y los tratados previamente con el inhibidor más el compuesto. Por lo que según este ensayo, no existiría un proceso autofágico en estas condiciones para ninguno de los tres productos evaluados.

<b>Tabla 14. Resultados de microscopía óptica para epimastigotes de <i>T. cruzi</i>, cepa Y, tratados durante 24 h con Nf1, Fx3 y Bfx1 en presencia y ausencia de 3-MA.</b>			
Compuesto/Concentración (μM)	Parásitos no teñidos con AT:	Parásitos con morfología normal (forma y tamaño):	Parásitos con movilidad normal:
Nf1\13	95 ± 5	44 ± 6	85 ± 7
Nf1\13 + 3-MA	93 ± 6	39 ± 7	81 ± 9
Fx3\45	91 ± 8	27 ± 6	65 ± 7
Fx3\45 + 3-MA	96 ± 4	31 ± 6	59 ± 7
Bfx1\65	89 ± 7	19 ± 5	42 ± 7
Bfx1\65 + 3-MA	92 ± 5	15 ± 6	38 ± 7
<b>Leyendas</b>			
	75 - 100 %		25 -50 %
	50 - 75 %		0 - 25 %

## 6. ESTUDIOS DEL MECANISMO DE ACCIÓN

### 6.1. Determinación del cambio metabólico en *T. cruzi* por <sup>1</sup>H-RMN

Como forma de evaluar la capacidad de los productos estudiados en esta tesis, de afectar el metabolismo de *T. cruzi* se utiliza la técnica de cuantificación de metabolitos excretados al medio de cultivo por <sup>1</sup>H-RMN. Esta técnica, implementada reciente en nuestro grupo de investigación [27], es sencilla ya que a diferencia de las técnicas bioquímicas estándares en un solo experimento se pueden identificar todos los metabolitos excretados.

Como se mencionó anteriormente (apartado 1.4.) este parásito es incapaz de oxidar completamente los carbohidratos produciendo una mezcla de CO<sub>2</sub>, ácidos mono y dicarboxílicos [26,31].

Es sabido de estudios previos que los principales metabolitos identificados en cultivos de *T. cruzi* en condiciones normales son carboxilatos (Ace, Lac, Pyr, Succ) y aminoácidos (Ala y Gly) [27]. Por lo que en una primera instancia para reconocer el perfil metabólico se comparan los espectros de <sup>1</sup>H-RMN del medio de cultivo, denominado “Control medio de cultivo”, y el medio con los metabolitos excretados por parásitos normales, denominado “Control parásitos metabolitos”. La identificación inequívoca de los diferentes metabolitos anteriormente mencionados se llevó a cabo mediante el agregado individual del correspondiente metabolito al “Control medio de cultivo” y al “Control parásitos metabolitos”. En la Fig. 31a y 31b (página siguiente) se muestran los espectros completos de ambos controles donde además de los metabolitos identificados se pueden observar las señales correspondientes a los protones metílicos (a aproximadamente 2,84 y 3,00 ppm) y el protón amídico (a aproximadamente 7,92 ppm) de la DMF que se utiliza como estándar interno (la señal de este último protón se integra y se asigna como 100, para realizar el posterior procesamiento de los espectros), los protones del DMSO, disolvente de los compuestos (a aproximadamente 2,71 ppm) y los protones del agua (a aproximadamente 4,8 ppm).

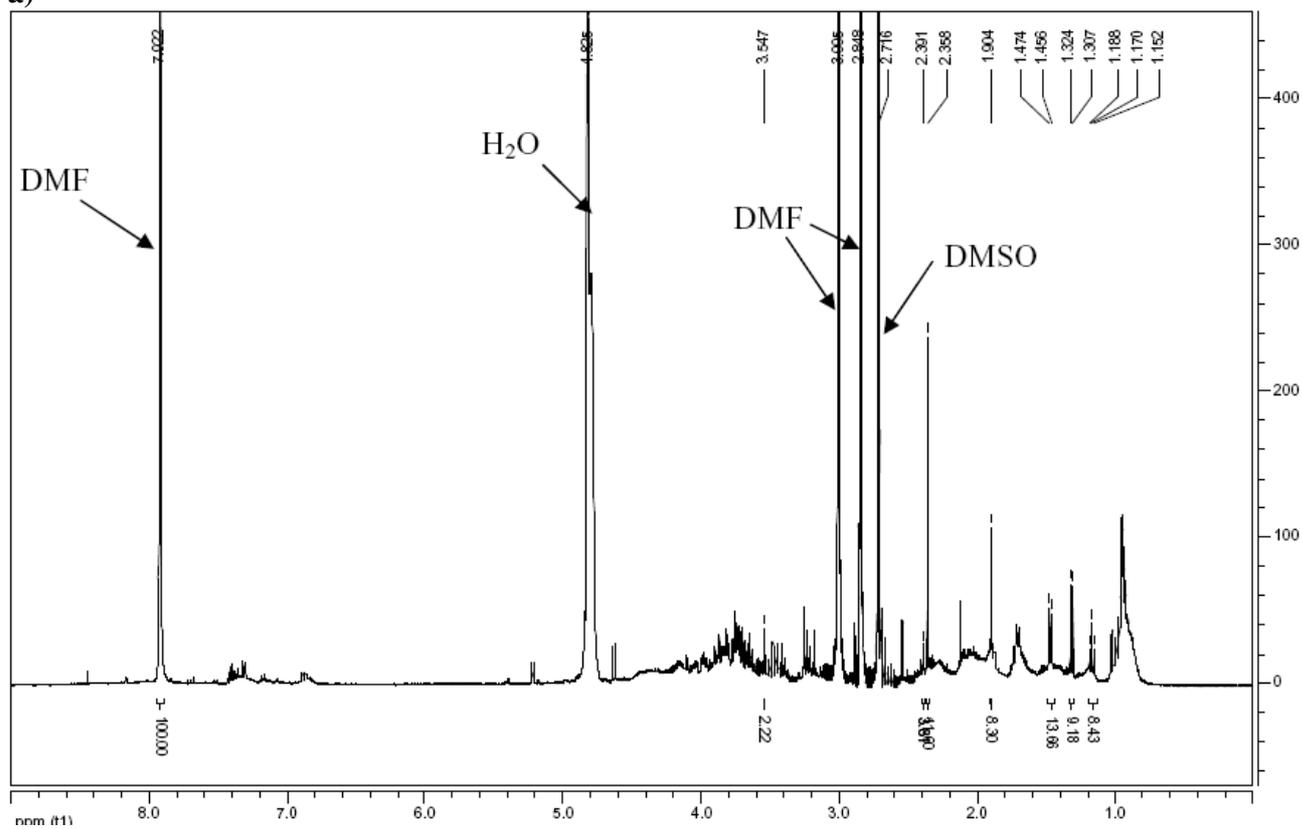
En la Fig. 31c y Fig. 31d se muestran las regiones de ambos espectros donde resuenan los metabolitos identificados. Las señales asignadas y los intervalos de integración que se toman para cada uno de los metabolitos principales se muestran en la Tabla 15. Cabe destacar particularmente que para la Ala, Lac y EtOH, algunas señales, las que por su acoplamiento son cuartetos, no se aprecian debido a las señales del ruido del medio de cultivo, pero igualmente la identificación de estos metabolitos se puede llevar a cabo sin problemas observando los demás señales. Para la Ala se observa la señal correspondiente a los protones del metilo (doblete) pero no así la señal correspondiente al protón en el carbono α (cuarteto). Para Lac se observa la señal correspondiente a los protones del metilo (doblete) pero no así la señal correspondiente al protón en el carbono α al grupo carboxilo (cuarteto). Para EtOH se observa la señal correspondiente a los protones del metilo (triplete) pero no así la señal correspondiente a los protones del metileno (cuarteto).

**Tabla 15. Asignación de las señales de metabolitos identificados en el medio de cultivo para epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Y.**

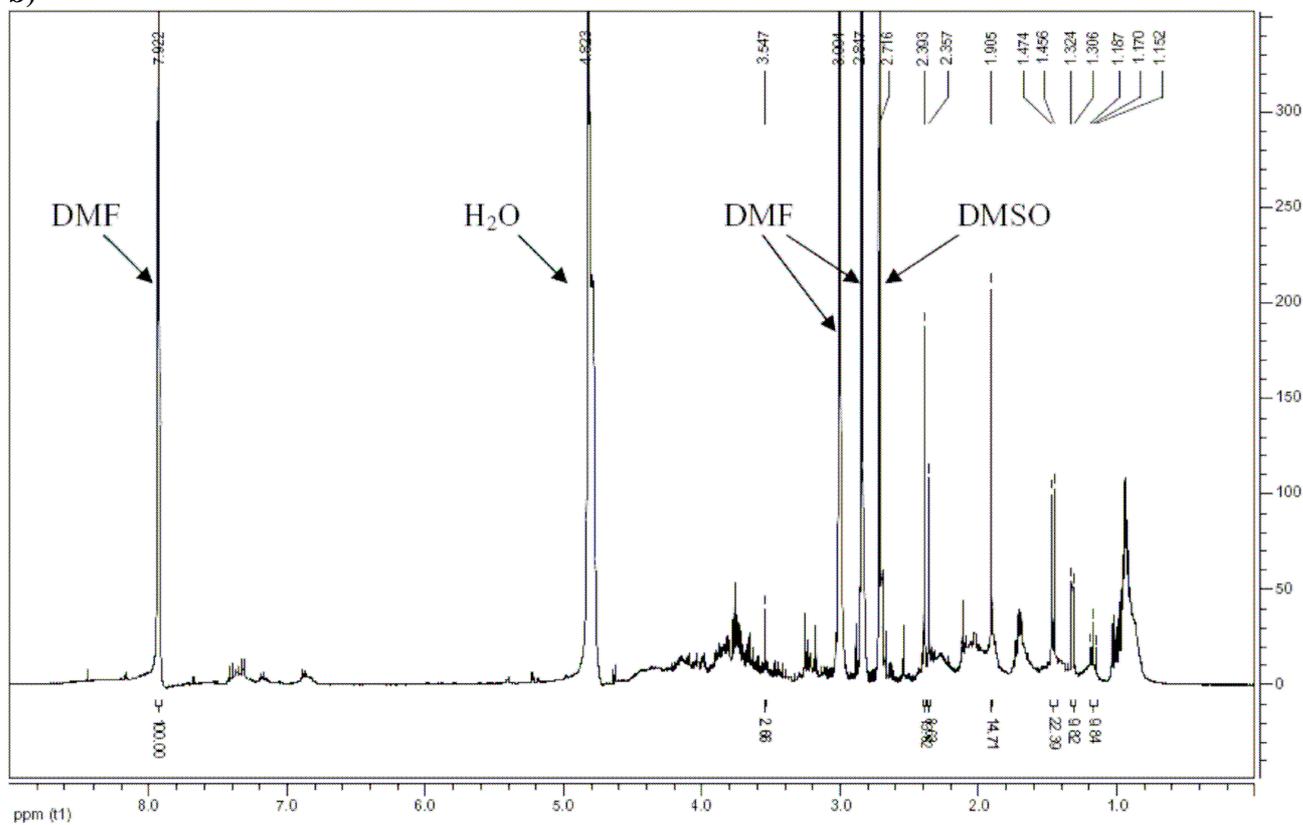
	<i>Gly</i>	<i>Succ</i>	<i>Pyr</i>	<i>Ace</i>	<i>Ala</i>	<i>Lac</i>	<i>EtOH</i>
$\delta^a$ (ppm)	3,547	2,391	2,358	1,904	1,465	1,316	1,170
<b>Multiplicidad</b>	s <sup>b</sup>	s	s	s	d <sup>c</sup>	d	t <sup>d</sup>
<b>Rango de integración</b>	3,552 a 3,542	2,402 a 2,376	2,367 a 2,347	1,912 a 1,897	1,488 a 1,436	1,338 a 1,296	1,198 a 1,136
<b>J(Hz)<sup>b</sup></b>	- <sup>c</sup>	-	-	-	7,24	6,85	7,08

<sup>a</sup> Los valores de  $\delta$  presentan un error de  $\pm 0,002$ . <sup>b</sup> Singulete. <sup>c</sup> Doblete. <sup>d</sup> Triplete. <sup>e</sup> Los valores de J (constante de acoplamiento) presentan un error de  $\pm 0,03$ . <sup>f</sup> No acopla.

a)



b)



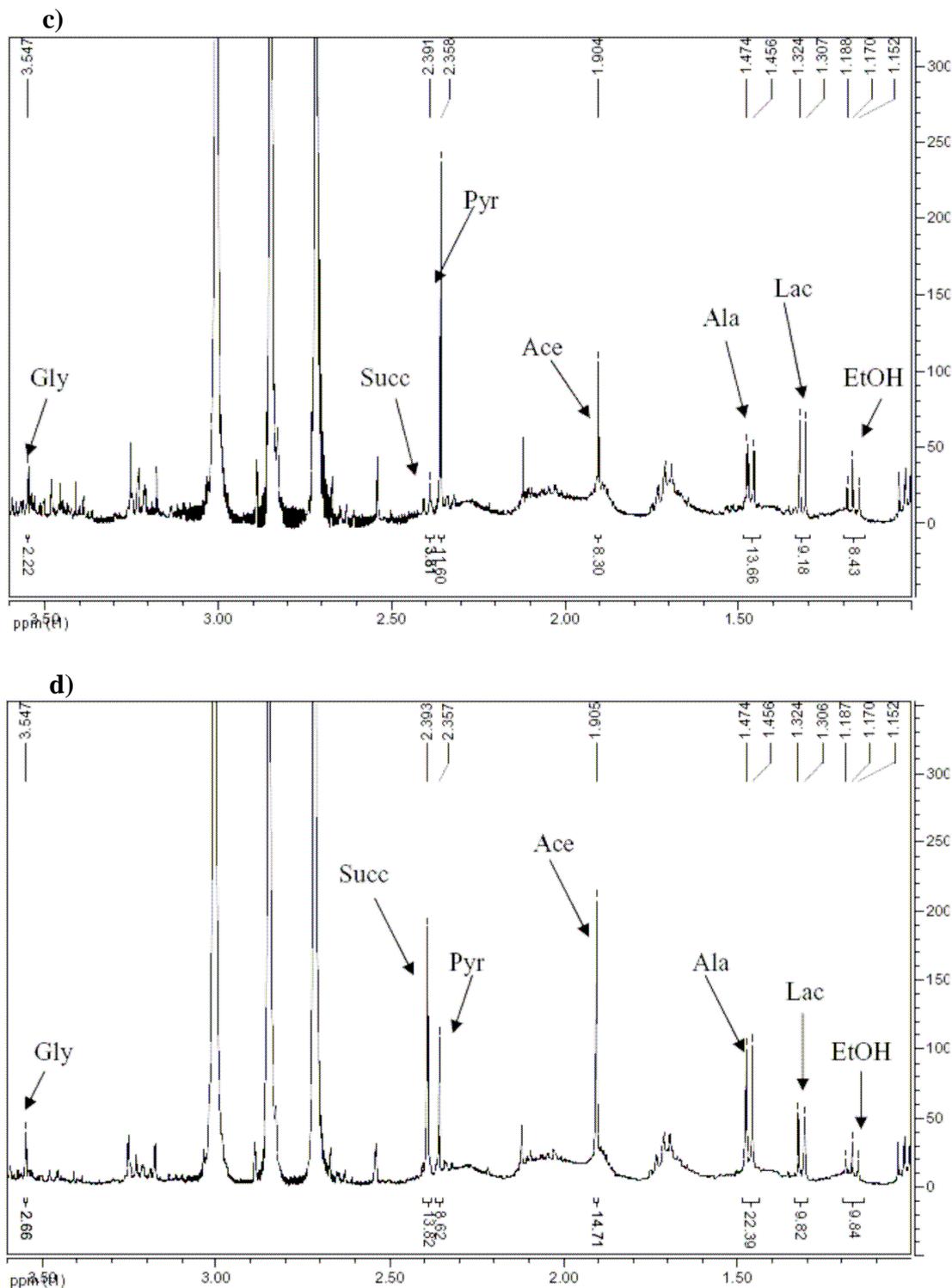


Fig. 31. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $22,16^\circ\text{C}$ ) de los controles utilizados en el estudio de metabolómica a) "Control medio de cultivo" de 0,0 a 9,0 ppm; b) "Control parásitos metabolitos" de 0,0 a 9,0 ppm. Con flechas se indican las señales de los protones de la DMF, agua y DMSO. c) y d) son ampliaciones correspondientes de la región 1,0 a 3,6 ppm de a y b), respectivamente. Con flechas se indica los metabolitos identificados.

También fueron analizados en este estudio los ácidos fumárico y maleico con la hipótesis de que compuestos que actúen como inhibidores de la succinato o la malato deshidrogenasa podrían afectar la concentración de dichos metabolitos (ver apartado 6.2.).

En estas condiciones el maleato y el fumarato no fueron detectados. Esto es concordante con lo que indica la literatura [26,31].

Como se puede observar en los espectros de la Fig. 31c y 31d, de todos los metabolitos excretados por los epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Y, se puede inferir de acuerdo a este estudio que el Succ es el metabolito más abundantemente excretado al medio de cultivo e interesantemente, la señal de Pyr es la única que disminuye en el "Control parásitos metabolitos" con respecto al "Control medio de cultivo", por lo que es posible inducir que los parásitos lo consumen. Este concuerda con lo que indica la literatura para epimastigotes de este tripanosomatídeo [26,31]. Por otra parte, cabe mencionar que las concentraciones de EtOH no varían significativamente lo cual coincide con lo que describe la mayor parte de la literatura donde se menciona que la mayoría de la cepas de *T. cruzi* no expresan las enzimas que le permiten producir este compuesto [26,31]. Sin embargo se han descrito ciertos clones de la cepa Bolivia de *T. cruzi* que producen EtOH [30]. Otro hecho destacado es que existe una clara señal del aminoácido Gly el cual nunca había sido descrito como metabolito de *T. cruzi*, existiendo descripciones sobre la capacidad de tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* de producir Gly [31].

La variación en la excreción de metabolitos de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Y, tratados con los diferentes compuestos a una concentración igual a las correspondientes IC<sub>50</sub> se muestra en la Tabla 16. Como se menciona en el apartado 3.3.1., los resultados se expresan como porcentaje de metabolito con respecto al control no tratado, "Control parásitos metabolitos".

**Tabla 16. Variación, respecto al "Control parásitos metabolitos", en el perfil de metabolitos de *T. cruzi*, cepa Y, tratados con los productos objeto de este proyecto de tesis a la IC<sub>50</sub> y "Control medio de cultivo"**

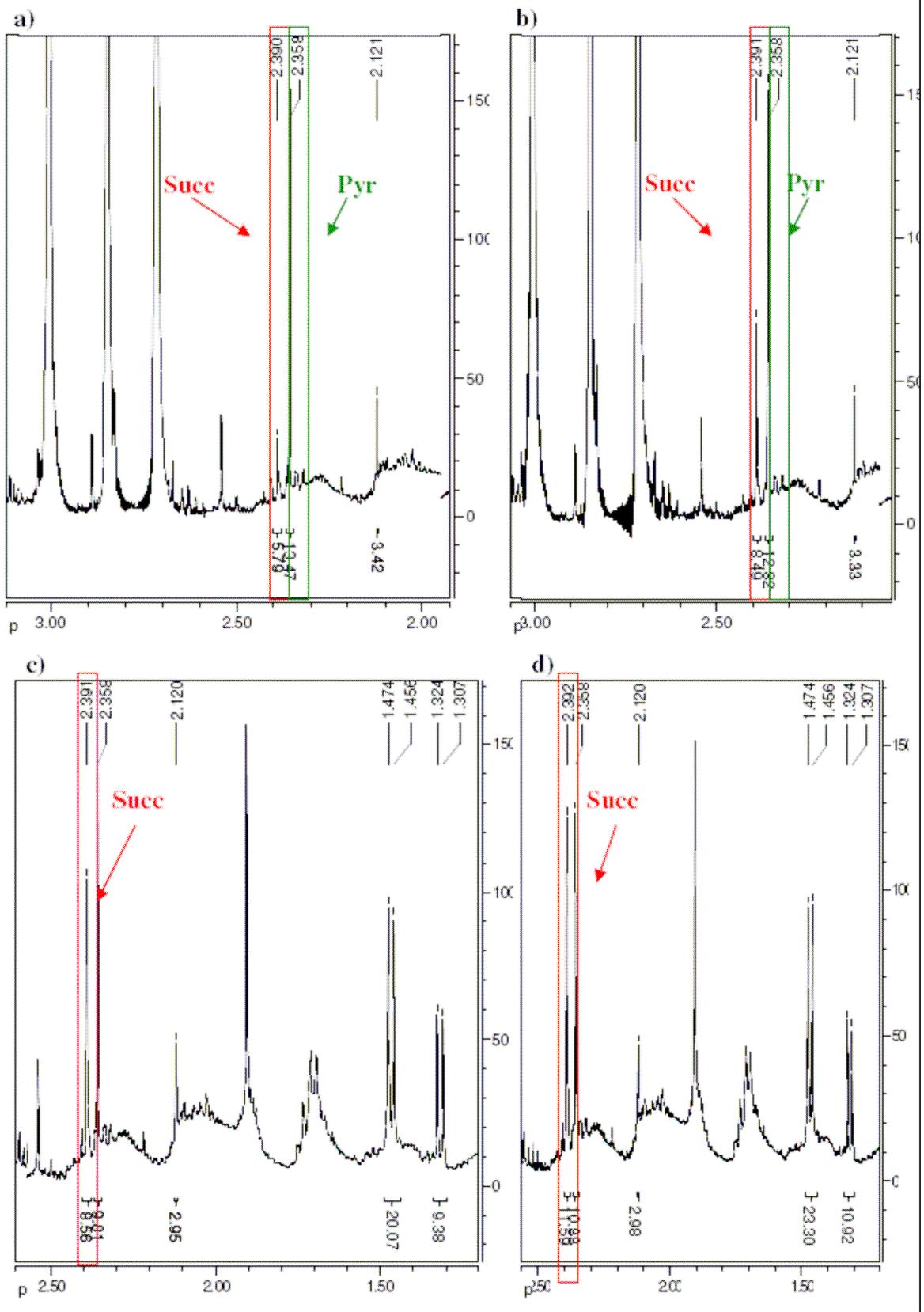
<b>Compuesto\ metabolito</b>	<b>Gly</b>	<b>Succ</b>	<b>Pyr</b>	<b>Ace</b>	<b>Ala</b>	<b>Lac</b>
<i>Nfx</i>	-9,6±2,0	-20,2±3,0	-3,5±1,1	-12,5 ± 2,8	-11,4±2,1	-8,1±0,9
<i>Nf1</i>	+21,8±3,0	-10,4±1,3	-3,9±1,0	-0,3 ± 1,6	-0,5±0,2	-4,7±0,6
<i>Fx1<sup>a</sup></i>	-13,7±2,6	-8,1±1,3	-1,4±0,8	-7,5 ± 1,6	-5,3±1,3	+3,9±1,3
<i>Fx2</i>	-1,2±0,7	-2,9±1,2	+7,3±2,2	-2,3 ± 1,0	+3,8±1,3	+8,8±1,7
<i>Fx3</i>	-5,7±0,9	-14,2±2,1	+3,2±2,2	-10,2 ± 2,1	-7,2±1,2	-1,5±0,7
<i>Bfx1</i>	-11,3±2,2	-11,2±2,6	+4,9±1,7	-11,7 ± 2,8	-15,9±2,0	+0,3±0,3
<i>Bfx2</i>	-8,3±2,1	+5,0±2,5	-2,0±1,1	-6,8 ± 2,7	-6,9±1,7	-7,3±1,2
<i>Qdo1</i>	-0,8±0,9	-33,4±2,2	+6,3±1,2	-11,6 ± 0,3	-8,6±1,7	+1,7±1,0
<i>Qdo2</i>	-10,5±2,2	-35,0±3,1	-11,4±1,4	-19,6 ± 3,0	-16,5±1,8	-12,8±2,0
<b>Medio<sup>b</sup></b>	-15,0±2,0	-70,5±4,0	+10,6±3,2	-39,5±3,9	-38,6±2,1	-12,4±2,7

Nota: Todos los compuestos fueron evaluados a su IC<sub>50</sub>. <sup>a</sup> *Fx1* fue evaluado a 300 μM, dado que por problemas de solubilidad no se pudo determinar su IC<sub>50</sub>.

<sup>b</sup> "Control medio de cultivo"

Todos los productos evaluados presentan un perfil de excreción metabólico diferente al de los parásitos sin tratar. Cabe destacar que los cambios más importantes vienen promovidos por las quinoxalinas (Qdo1, Qdo2) y *Nfx* en la menor excreción de Succ (Fig. 32). Por otro lado, Qdo2 y *Nfx* presentan además una coincidencia generalizada en el perfil de metabolitos excretados, hecho que podría estar indicando que ambos productos actúan de forma similar. Qdo1 a diferencia de los anteriores presenta menor consumo de Pyr. Esto estaría indicando diferencias en el modo de acción de este dióxido de quinoxalina respecto al otro. Con respecto al nitrofurano incluido en el estudio para comparar su comportamiento con el de los *N*-óxidos, *Nf1*,

presenta un significativo aumento en la excreción de Gly y disminución en Succ poseyendo un perfil de metabolitos diferente al de los *N*-óxidos y al nitrofurano fármaco de referencia, Nfx.



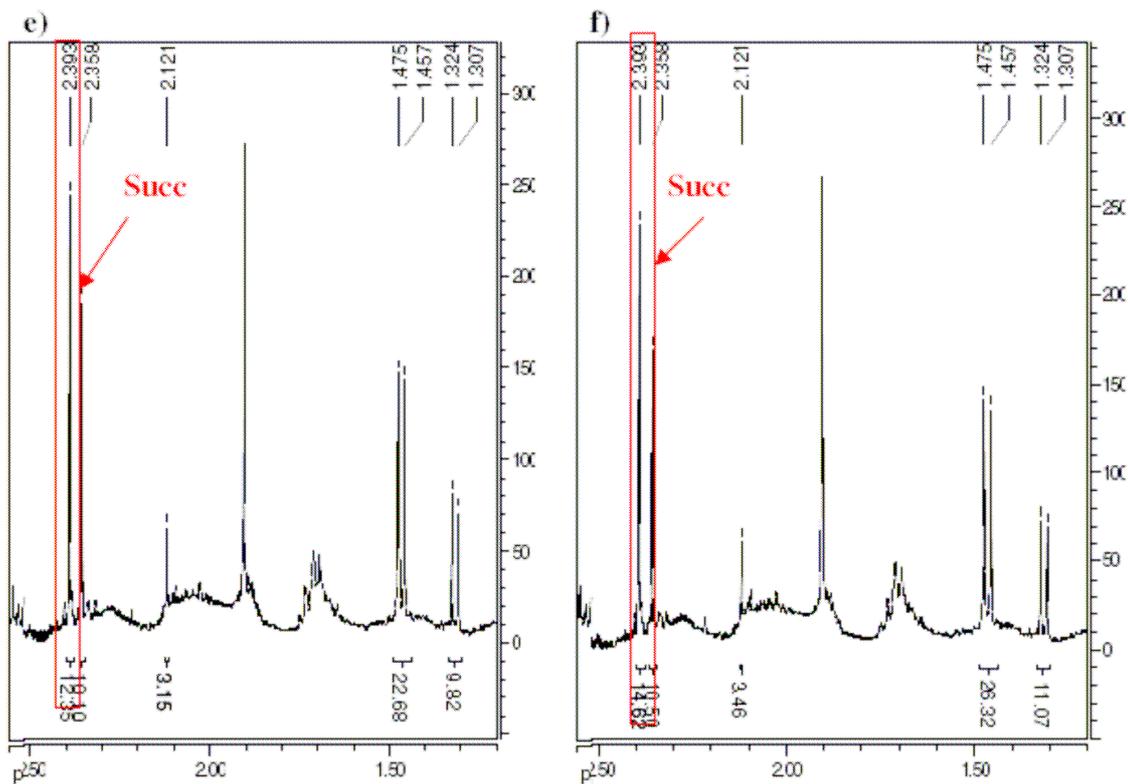


Fig. 32. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $22,16^\circ\text{C}$ ) donde se muestra el perfil de los metabolitos excretados a-b) Parásitos tratados a una  $\text{IC}_{50}$  con  $\text{Qdo1}$  y su correspondiente "Control parásitos metabolitos", respectivamente: se marca en rojo el pico correspondiente al Succ, observar como disminuye su excreción. Se marca en verde el pico correspondiente Pyr, observar como disminuye su consumo. c-d) Parásitos tratados a una  $\text{IC}_{50}$  con  $\text{Qdo2}$  y su correspondiente "Control parásitos metabolitos", respectivamente: se marca en rojo el pico correspondiente al Succ, observar como disminuye su excreción, al igual que ocurre para todos los metabolitos excretados. e-f) Parásitos tratados a una  $\text{IC}_{50}$  de  $\text{Nfx}$  y su correspondiente "Control parásitos metabolitos", respectivamente: se marca en rojo el pico correspondiente al Succ, observar como disminuye su excreción, al igual que ocurre para todos los metabolitos excretados.

Los tres furoxanos, Fx1, Fx2 y Fx3, presentan perfiles metabólicos muy similares y de escasa significación respecto al parásito sin tratar, también disminuyen la excreción de Succ y Fx1 de forma significativa Gly (Fig. 33). Por otro lado, Fx2 curiosamente disminuye el consumo del Pyr y parece tener un efecto importante en las rutas metabólicas que involucran a Pyr, ya que productos metabólicamente relacionados con él, Ala y Lac, aparecen incrementados en el medio de cultivo (Fig. 33).

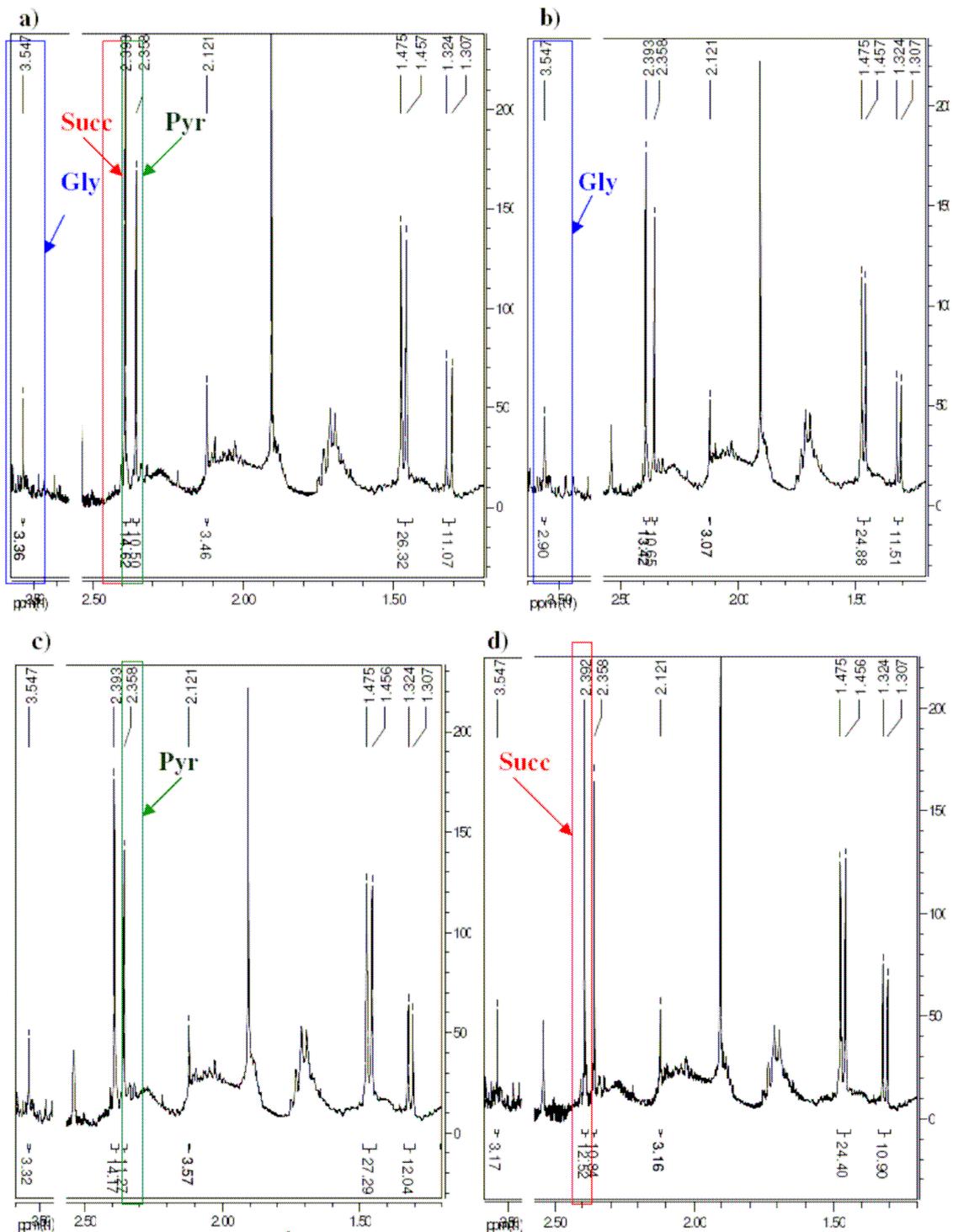


Fig. 33. Espectros de  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $22,16^\circ\text{C}$ ) donde se muestra el perfil de los metabolitos excretados a) "Control parásitos metabolitos", b) parásitos tratados con una  $\text{IC}_{50}$  de Fx1, c) parásitos tratados a una  $\text{IC}_{50}$  de Fx2, d) parásitos tratados con una  $\text{IC}_{50}$  de Fx3. Se indican para los furoxanos las principales variaciones metabólicas respecto al "Control parásitos metabolitos". En color azul se indica el pico correspondiente a la Gly, observar como disminuye su excreción para los parásitos tratados con Fx1. En color verde se indica el indica el pico correspondiente al Pyr, observar como disminuye su consumo para los parásitos tratados con Fx2. En color rojo se indica el pico correspondiente al Succ, observar como disminuye su excreción para los parásitos tratados con Fx3.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente mencionadas se decide profundizar el estudio con los productos que muestran diferencias metabólicas más significativas, Nf1, Qdo1 y Qdo 2, respecto al "Control parásitos metabolitos". Para ello Nf1, Qdo1 y Qdo2 fueron estudiados por esta técnica en un experimento dosis–respuesta incluyendo a Nfx, como fármaco de referencia. Los resultados se muestran en las Fig. 34-37.

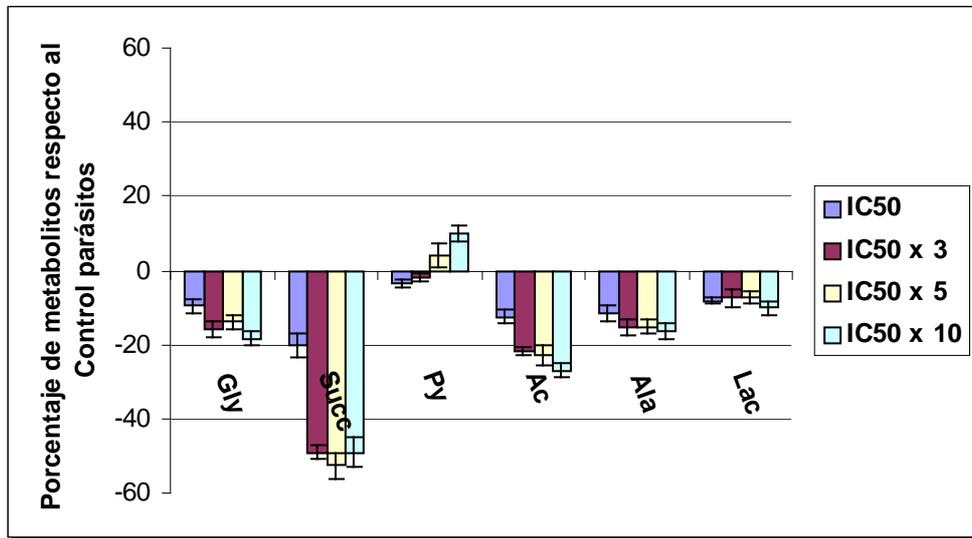


Fig. 34. Dosis-respuesta del estudio de metabolismo para Nfx.

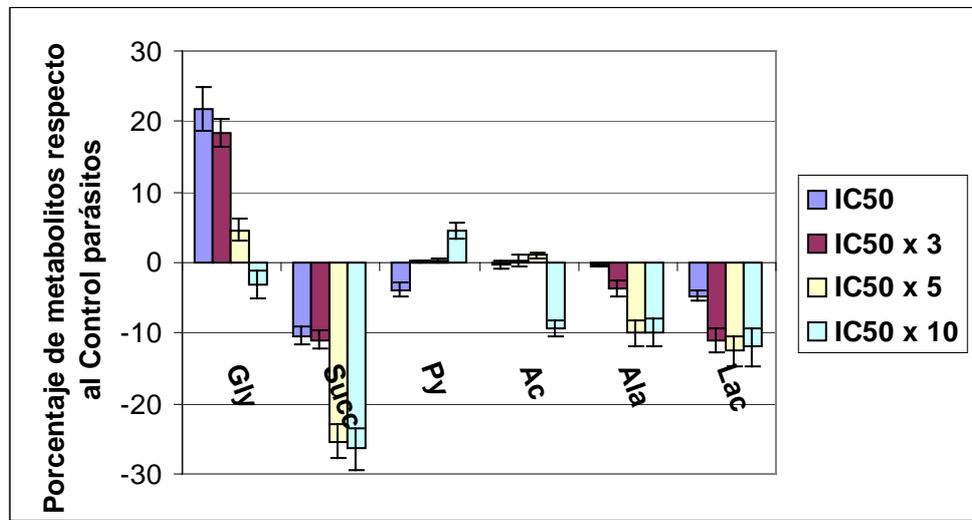


Fig. 35. Dosis-respuesta del estudio de metabolismo para Nf1.

Si se analiza el comportamiento metabólico para los dos nitrofuranos, Nfx y Nf1, en el estudio dosis-respuesta se puede concluir que, excepto por la Gly, ambos compuestos poseen un perfil muy similar (importante disminución de la excreción de Succ, leve disminución en el consumo de Pyr con la dosis y moderada disminución en la excreción de Ala y Lac).

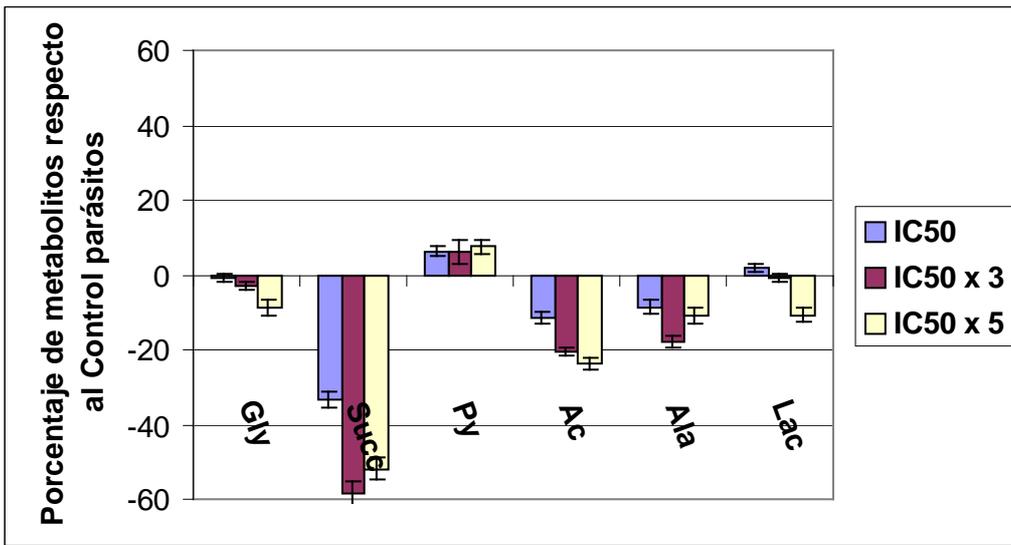


Fig. 36. Dosis-respuesta del estudio de metabolismo para Qdo1.

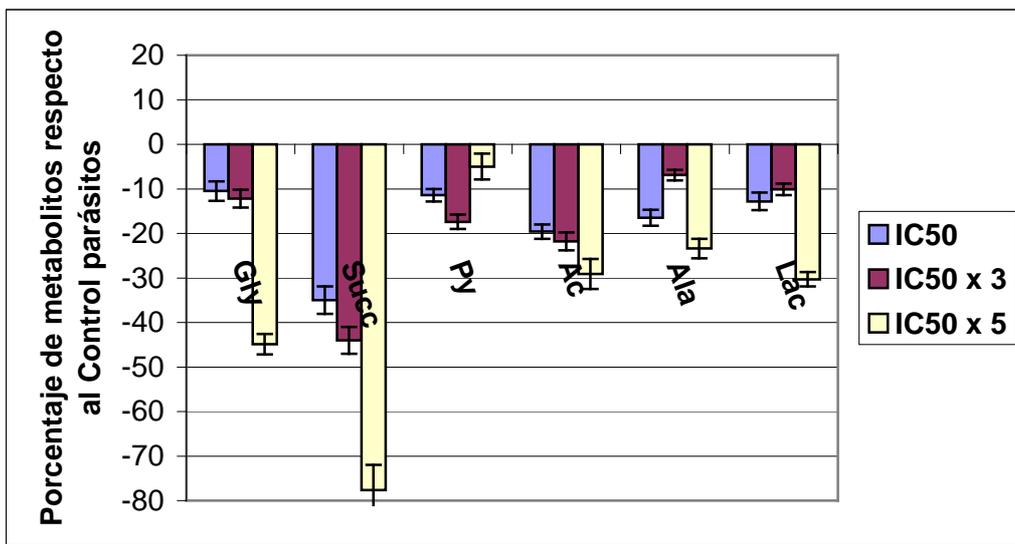


Fig. 37. Dosis-respuesta del estudio de metabolismo para Qdo2.

Del estudio con Qdo1, Qdo2 y Nf1 se puede inferir que existe dependencia dosis-respuesta para casi todos los metabolitos evaluados. Los tres muestran una disminución importante de Succ, que en el caso de Qdo2 y Nf1 parece mostrar una dependencia directa.

Por otra parte para Qdo2 la disminución de la excreción de Gly es relevante al aumentar la dosis del ensayo, a diferencia de lo que sucede con Qdo1 en donde los cambios para este metabolito no son importantes. Sin embargo, en el caso de Nf1 se observa una importante excreción de Gly a concentraciones de una y tres  $IC_{50}$ .

En estos experimentos de dosis-respuesta puede observarse que al aumentar la concentración de los compuestos hasta llegar a condiciones de muerte, los perfiles se vuelven más parecidos al "Control medio de cultivo", es decir, aumenta la concentración de Pyr en el medio y disminuye la concentración de los metabolitos excretados (Tabla 16, medio).

## 6.2. Determinación de la actividad inhibitoria de enzimas deshidrogenasas mitocondriales

Del estudio descrito en el apartado anterior uno de los metabolitos que se excreta en menor medida respecto al parásito sin tratamiento es Succ. Por otro lado, recientemente nuestro grupo ha identificado que ciertos *N*-óxido de aminas heterocíclicas aromáticas que son capaces de afectar el metabolismo redox de *T. cruzi*, afectando por ejemplo mitocondrias, inhibiendo deshidrogenasas mitocondriales [5b,27]. Por lo que, basados en estos aspectos se estudian los compuestos de este proyecto de tesis como inhibidores de dichas enzimas. En las condiciones del ensayo, a tiempos cortos usando MTT para detectar actividad deshidrogenasa se evalúa enzimas específicas como succinato y malato deshidrogenasas. Los ensayos inicialmente fueron realizados a concentración fija, 20  $\mu$ M y tiempos variables cortos de entre 30 y 120 min como se muestran en la Tabla 17.

**Tabla 17. Porcentaje<sup>a</sup> de actividad de enzimas deshidrogenasas mitocondriales.**

Compuesto\ tiempo (min)	30	60	90	120
Nfx	91,2 $\pm$ 1,2	100,0 $\pm$ 0,7	98,5 $\pm$ 2,1	100,0 $\pm$ 0,9
Nf1	100,0 $\pm$ 2,8	82,2 $\pm$ 2,5	55,4 $\pm$ 7,2	50,0 $\pm$ 2,5
Fx1	90,3 $\pm$ 0,7	89,1 $\pm$ 0,4	100,0 $\pm$ 1,0	100,0 $\pm$ 0,9
Fx2	87,4 $\pm$ 0,6	69,6 $\pm$ 1,6	100,0 $\pm$ 0,6	99,1 $\pm$ 1,1
Fx3	84,0 $\pm$ 1,7	88,5 $\pm$ 2,0	92,7 $\pm$ 1,0	94,6 $\pm$ 1,4
Bfx1	77,5 $\pm$ 1,2	90,0 $\pm$ 0,7	87,9 $\pm$ 2,5	77,9 $\pm$ 3,0
Bfx2	86,8 $\pm$ 0,3	89,9 $\pm$ 0,7	100,0 $\pm$ 1,6	100,0 $\pm$ 0,6
Qdo1	91,1 $\pm$ 2,3	62,9 $\pm$ 4,5	39,5 $\pm$ 4,1	40,3 $\pm$ 7,4
Qdo2	69,7 $\pm$ 2,6	69,6 $\pm$ 2,4	70,3 $\pm$ 1,8	46,1 $\pm$ 8,4

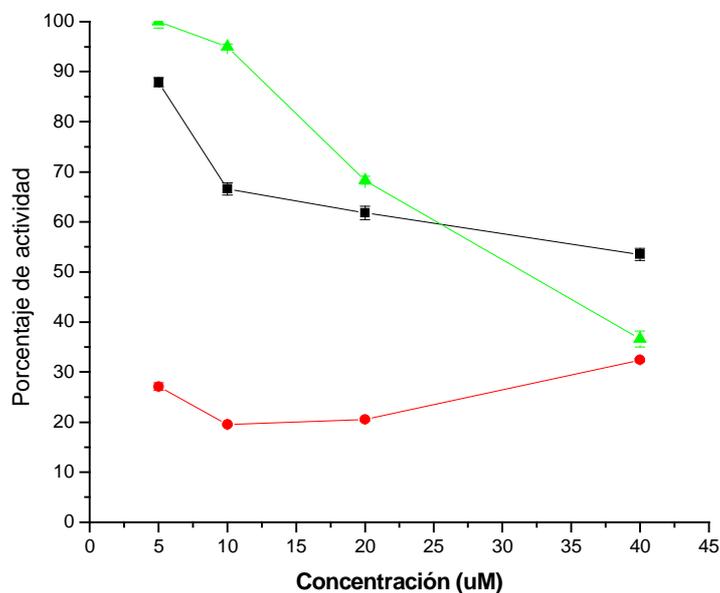
<sup>a</sup> Referido a la actividad deshidrogenasa de parásitos no tratados.

De todos los compuestos estudiados, Nf1, Qdo1 y Qdo2 son las moléculas que provocan mayor inhibición de las enzimas en estudio y en menor proporción lo hace Bfx1. Cabe mencionar que Nfx no inhibe las deshidrogenasas mitocondriales. Para los tres productos, Nf1, Qdo1 y Qdo2, se observa que a los 90 min la disminución de la actividad es significativamente importante por lo que se elige este tiempo para los ensayos de dosis-respuesta (Fig. 38, página siguiente) a concentraciones de 5, 10, 20 y 40  $\mu$ M.

Los parásitos tratados con Nf1 y Qdo2 muestran una clara relación dosis-respuesta, sin embargo esto no ocurre para el caso de Qdo1, con este último compuesto existe una importante disminución de la actividad para todas de las concentraciones evaluadas. Los tres compuestos por tanto actuarían por inhibición de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales.

Como ya se mencionó en el apartado 1.4., la enzima succinato deshidrogenasa (paso 33, complejo II de la cadena respiratoria, Fig. 11, conversión de Succ en fumarato), es un complejo enzimático homólogo a la fumarato reductasa mitocondrial (paso 20, Fig. 11) que cataliza la reacción inversa. Se ha postulado que inhibidores de la succinato deshidrogenasa actuarían sobre la fumarato reductasa y viceversa [27,55]. Considerando esto último y habiendo evidenciado una clara disminución de la excreción de Succ e inhibición de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales, se podría decir que la enzima

blanco de estos compuestos sería la fumarato reductasa. También se puede considerar la inhibición específica o simultánea de la malato deshidrogenasa (paso 34, Fig. 11), su inhibición podría perfectamente explicar la disminución de la concentración del Succ excretado. Aunque Nf1 podría estar modificando otros puntos metabólicos, paralelamente, que explique la alta liberación de Gly al medio.



*Fig. 38. Curvas dosis-respuesta de actividad de deshidrogenasas mitocondriales a los 90 min: en rojo Qdo1, en verde Qdo2 y en negro Nf1.*

## 7. CONCLUSIONES

Se determinaron las condiciones preliminares de muerte por microscopía óptica de todos los productos objeto de esta tesis, para luego confirmar el tipo de muerte celular por técnicas estándar. En todas las condiciones evaluadas, y para todos los compuestos, la técnica TUNEL da resultados negativos, por lo que se puede concluir que el mecanismo de muerte de los parásitos no sería apoptosis en esas condiciones.

Es de destacar que para Qdo1 y Qdo2, por tinción con IP se confirma muerte por necrosis en tiempos menores a 6 h y concentraciones menores a 20  $\mu$ M.

El tratamiento de *T. cruzi* con Nf1, Fx3 y Bfx1 generan estructuras citoplasmáticas vacuolares que se aprecian aun en microscopía óptica. La ultraestructura de los parásitos tratados con estos productos corrobora la forma y distribución de éstas en los mismos. Se observa que estas estructuras ocupan casi la totalidad del parásito, que se encuentran cerca del retículo endoplasmático, que poseen doble membrana, y que pierden electrondensidad, lo que podría estar indicando que se trata de autofagosomas. El inhibidor de autofagia evaluado, 3-MA, no fue capaz de bloquear la formación de vesículas y detener el proceso de muerte. No se pueden sacar conclusiones respecto a que la autofagia es el tipo de muerte celular para los parásitos tratados con Nf1, Fx3 y Bfx1.

Se implementa por primera vez la técnica de  $^1\text{H}$ -RMN para el estudio del tipo de muerte celular en epimastigotes de *T. cruzi*. Para ello se trabaja con  $\text{H}_2\text{O}_2$  como inductor de apoptosis determinando que, al igual que en células mamíferas apoptóticas, se observa un significativo aumento de la relación  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  de los lípidos móviles. Este mismo fenómeno se observa con el paso del tiempo y principalmente en la fase estacionaria de crecimiento para epimastigotes, cepa Y creciendo en medio axénico.

Para los procesos necróticos obtenidos con parásitos tratados con Nfx y Qdo2 se confirma que la relación de  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  no aumenta, hecho que concuerda con lo observado para células mamíferas necróticas.

Por otro lado, se estudió el cambio en el perfil metabólico de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Y, tratados con los compuestos de este estudio. Para ello se utilizó la medida, por  $^1\text{H}$ -RMN, de la variación de los metabolitos en el medio de cultivo de estos parásitos. Los productos que más cambian este perfil metabólico son las quinoxalinas, Qdo1 y Qdo2, y los nitrofuranos, Nf1 y Nfx, los cuales determinan una importante disminución de la excreción del succinato. Particularmente Nf1 a diferencia del resto de los productos aumenta la excreción de glicina.

Adicionalmente, Qdo1, Qdo2 y Nf1 mostraron actividad inhibitoria de enzimas deshidrogenasas mitocondriales. Esto junto con los estudios del perfil metabólico permite hipotetizar que la enzima blanco de estos dos compuestos es la fumarato reductasa, aunque no puede descartarse la inhibición de la malato deshidrogenasa.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] a) <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>. b) Estimación Cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Department of Control of Neglected Tropical Diseases (NTD). Innovative and Intensified Disease Management (IDM). WHO/NTD/IDM. OPS/HDM/CD/425-06. c) A 100 años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas. Contribuciones desde Uruguay. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. HSD/CD/550-09. Montevideo, Uruguay, 2009.
- [2] a) Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. Cerecetto, H., González, M. *Curr. Trop. Med. Chem.* 2002, 2: 1187. b) Synthetic medicinal chemistry in Chagas' Disease: Compounds at the final stage of "Hit-To-Lead" phase. Cerecetto, H., González, M. *Pharmaceuticals*, 2010, 3: 810.
- [3] Free radical metabolism of antiparasitic agents. Docampo, R., Moreno, S.N.J. *Fed. Proc.* 1986, 45: 2471.
- [4] Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Docampo, R. *Chem. Biol. Interact.* 1990, 73: 1.
- [5] a) Boiani M., Tesis de Doctorado en Química: Generación de modelos de clasificación de actividad antichagásica y estudio de mecanismos de acción: aplicación en la búsqueda de nuevos fármacos anti-*Trypanosoma cruzi*, Facultad de Química, Universidad de la República, 2007. b) Mode of action of nifurtimox and *N*-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved? Boiani, M., Piacenza, L., Hernández, P., Boiani, L., Cerecetto, H., González, M., Denicola, A. *Biochem. Pharmacol.* 2010, 79: 1736. c) Boiani, M., Cerecetto, H., González, M., Gasteiger, J. Modeling anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *N*-oxide containing heterocycles. *J. Chem. Inf. Model.* 2008, 48: 213.
- [6] Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Maya, J.D., Cassels, B.K., Iturriaga-Vasquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., Morello, A. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2007, 146: 601.
- [7] Expansion and evolution of cell death programmes. Degterev, A., Yuan, J. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2008, 9: 378.
- [8] Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Kerr, J. F. R., Wyllie, A.H., Currie, A. R. *Br. J. Cancer.* 1972, 26: 239.
- [9] Apoptosis – the p53 network. Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., Haupt, Y. *J. Cell Sci.* 2003, 116: 4077.
- [10] Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. Ameisen, J.C., Idziorek T., Billaut-Mulot, O., Loyens, M., Tissier, J.P., Potentier, A., Ouaiissi, A. *Cell Death Differ.* 1995, 2: 285.
- [11] Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. Jiménez, V., Paredes, R., Sosa, M.A., Galanti, N. *J. Cell. Biochem.* 2008, 9999:1.
- [12] Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. Piacenza, L., Irigoín, F., Álvarez, M.N., Peluffo, G., Taylor, M.C., Kelly, J.M., Wilkinson, S.R., Radi, R. *Biochem. J.* 2007, 403: 323.
- [13] Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. Debrabant, A., Lee, N., Bertholet, S., Duncan, R., Nakhasi, H. L. *Int. J. Parasitol.* 2003, 33: 57.
- [14] The molecular biology of apoptosis. Vaux, D. L., Strasser, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996, 93: 2239.
- [15] Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: Possible candidates for programmed cell death mediators. Kosec, G., Alvarez, V. E., Aguero, F., Sánchez, D., Dolinar, M., Turk B., Turk, V., Cazzulo, J.J. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006, 145: 18.

- [16] Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. Manika, D., Sikha, B., Mukherjee, C. S. J. Cell Sci. 2001, 114: 2461.
- [17] a) Analysis of <sup>1</sup>H NMR-detectable mobile lipid domains for assessment of apoptosis induced by inhibitors of DNA synthesis and replication. Mikhailenko, V.M., Philchenkov, A.A., Zavelevich, M.P. Cell Biol. Int. 2005, 29: 33. b) Two-step formation of <sup>1</sup>H NMR visible mobile lipids during apoptosis of paclitaxel-treated K562 cells. Brisdelli, F., Iorio, E., Knijn, A., Ferretti, A., Marcheggiani, D., Lenti, L., Strom, R., Podo, F., Bozzi, A. Biochem. Pharmacol. 2003, 65: 1271.
- [18] a) Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. de Souza, W., Fernandes Rodrigues, J.C. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. 2009, 2009: 642502. b) Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Alvarez, V. E., Kosec, G., Sant'Anna, C., Turk, V., Cazzulo, J.J., Turk B. J. Biol. Chem. 2008, 283: 3454.
- [19] Blocking autophagy to prevent parasite differentiation. A possible new strategy for fighting parasitic infections? Alvarez, V.E., Kosec, G., Sant'Anna, C., Turk, V., Cazzulo, J.J., Turk, B. Autophagy, 2008, 1: 361.
- [20] a) Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. Menna-Barreto, R.F.S., Corrêa, J.R., Cascabulho, C.M., Fernandes, M.C., Pinto, A.V., Soares, M.J., De Castro, S.L. Parasitology, 2009, 136: 499. b) Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: An ultrastructural study. Menna-Barreto, R.F.S., Salomao, K, Dantas, A.P., Santa-Rita, R. M., Soares, M.J., Barbosa, H.S., De Castro, S.L. Micron, 2009, 40: 157.
- [21] a) Culture of animal cells: A manual of basic technique. Freshney, R. 1987, p. 117. Alan R. Liss, Inc., New York. b) Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. Moreno, E., García, C., Dueñas, A. Revista del Instituto Nacional de Cancerología, 2000, 46: 275.
- [22] a) L-Arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: Contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. Piacenza, L., Peluffo, G., Radi, R. Proc. Natl. Acad. Sci. 2001, 98: 7301. b) Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. Deolindo, P., Teixeira-Ferreira A.S., Melo, E., Veto Arnholdt, A.C., de Souza, W., Alves, E.W., Da Matta, R.A. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2005, 100: 33.
- [23] a) Detection of apoptotic cell death by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Blankenberg, F.G., Storrs, R.W., Naumovski, L., Goralski, T., Spielman, D. Blood, 1996, 87: 1951. b) Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Blankenberg, F.G., Katsikis, P.D., Storrs, R.W., Beaulieu, C., Spielman, D. Blood, 1997, 89: 3778. c) Detection of apoptosis and necrosis in normal human lung cells using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. Shih, C.M., Ko, W.C., Yang, L.Y., Lin, C.J., Wu, J.S., Lo, T.Y., Wang, S.H., Chen, C.T. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005; 1042: 488.
- [24] <sup>1</sup>H-NMR visible lipids in the life and death of cells. Hakumäki, J. M., Kauppinen, R. A. Trends Biochem. Sci. 2000, 25: 357.
- [25] <sup>1</sup>H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the *in vivo* detection of apoptosis. Hakumäki, J.M., Poptani H., Sandmair A.M., Ylä-Herttua S., Kauppinen R.A. Nat. Med. 1999, 5: 1323.
- [26] Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. Cazzulo, J.J. FASEB J. 1992, 6: 3153.
- [27] Furoxan-, alkylnitrate-derivatives and related compounds as anti-trypanosomatid agents: Mechanism of action studies. Boiani, L., Aguirre, G., González, M., Cerecetto, H., Chidichimo, A., Cazzulo, J.J., Bertinaria, M., Guglielmo, S. Bioorg. Med. Chem. 2008, 16: 7900.
- [28] Second generation of 2*H*-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives as anti-trypanosomatid agents: Synthesis, biological evaluation, and mode of action studies. Boiani, M., Boiani, L., Alicia, A., Hernández, P., Chidichimo, A., Cazzulo, J.J., Cerecetto, H., González, M. Eur. J. Med. Chem. 2009, 44: 4426.

- [29] Activity and mode of action of acridine compounds against *Leishmania donovani*. Mesa-Valle, C.M., Castilla-Calvente, J., Sanchez-Moreno, M., Moraleda-Lindez, V., Barbe, J., Osuna, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996, 40: 684.
- [30] Proton nuclear magnetic resonance analysis of metabolic end products of the Bolivia strain of *Trypanosoma cruzi* and three of its clones. Penin, P., Sanchez-Moreno, M., de Diego J.A. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 1998, 120: 571.
- [31] Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. Bringaud, F., Rivière, L., Coustou, V. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006, 149: 1.
- [32] Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme. NADH-dependent fumarate reductase. Besteiro, S., Biran, M., Biteau, N., Coustou, V., Baltz, T., Canioni, P., Bringaud, F.J. *Biol. Chem.* 2002, 277: 38001.
- [33] A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic *Trypanosoma brucei*. Coustou V., Besteiro S., Riviere L., Biran, M., Biteau, N., Franconi, J. M., Boshart, M., Baltz, T., Bringaud, F.J. *Biol. Chem.* 2005, 280: 16559.
- [34] Comparative proteomics of glycosomes from bloodstream form and procyclic culture form *Trypanosoma brucei brucei*. Colasante, C., Ellis, M., Ruppert, T., Voncken, F. *Proteomics*, 2006, 6: 3275.
- [35] 1,2,5-Oxadiazole *N*-oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs: structure-activity relationships. Cerecetto, H., Di Maio, R., González, M., Risso, M., Saenz, P., Seoane, G., Denicola, A., Peluffo, G., Quijano, C., Olea-Azar, C. *J. Med. Chem.* 1999, 42: 1941.
- [36] *In vitro* activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. Aguirre, G., Boiani, L., Cerecetto, H., Fernández, M., González, M., Denicola, A., Otero, L., Gambino, D., Rigol, C., Olea-Azar, C., Faúndez, M. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12: 4885.
- [37] New potent 5-substituted benzofuroxans as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth. Quantitative structure-activity relationship studies. Aguirre, G., Boiani, L., Boiani, M., Cerecetto, H., Di Maio, R., González, M., Porcal, W., Denicola, A., Piro, O.E., Castellano, E.E., Sant'Anna, C.N.R., Barreiro, E.J. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13: 6336.
- [38] Benzo[1,2-*c*]1,2,5-Oxadiazole *N*-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Part III. substituents-clustering methodology in the search of new active compounds. Aguirre, G., Boiani, L., Cerecetto, H., Di Maio, R., González, M., Porcal, W., Denicola, A., Möller, M., Thomson, L., Tórtora, V. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13: 6324.
- [39] Novel antiprotozoal products: imidazole and benzimidazole *N*-oxide derivatives and related compounds. Aguirre, G., Boiani, M., Cerecetto, H., Gerpe, A., González, M., Fernández Sainz, Y., Denicola, A., Ochoa de Ocariz, C., Nogal, J.J., Montero, D., Escario, J.A. *Arch. Pharm.* 2004, 337: 259.
- [40] Quinoxaline *N,N'*-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. structure-activity relationships. Aguirre, G., Cerecetto, H., Di Maio, R., González, M., Montoya Alfaro, M.E., Jaso, A., Zarranz, B., Ortega, M.A., Aldana, I., Monge-Vega, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14: 3835.
- [41] Benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazole *N*-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Structure-activity relationships. Part II. Aguirre, G., Cerecetto, H., Di Maio, R., González, M., Porcal, W., Seoane, G., Denicola, A., Ortega, M.A., Aldana, I., Monge-Vega, A. *Arch. Pharm.* 2002, 335: 15.
- [42] 2*H*-Benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: A new family of water-soluble anti-trypanosomatid. Boiani, M., Boiani, L., Denicola, A., Torres de Ortiz, S., Serna, E., Vera de Bilbao, N., Sanabria, L., Yaluff, G., Nakayama, H., Rojas de Arias, A., Vega, C., Rolan, M., Gómez-Barrio, A., Cerecetto, H., González, M. *J. Med. Chem.* 2006, 49: 3215.
- [43] Indazole *N*-oxide derivatives as antiprotozoa agents. Synthesis, biological evaluation and QSAR studies. Gerpe, A., Aguirre, G., Boiani, L., Cerecetto, H., González, M., Olea-Azar, C.,

- Rigol, C., Maya, J.D., Morello, A., Piro, O.E., Arán, V.J., Azqueta, A., López de Ceráin, A., Monge, A., Rojas, M.A., Yaluff, G. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14: 3467.
- [44] Anti-*T. cruzi* agents: our experience in the evaluation of more than five hundred compounds. Cerecetto, H., González, M. *Mini Rev. Med. Chem.* 2008, 8: 1355.
- [45] Second generation of 5-ethenylbenzofuroxan derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Synthesis, biological evaluation, and structure–activity relationships. Porcal, W., Hernández, P., Aguirre, G., Boiani, L., Boiani, M., Merlino, A., Ferreira, A., Di Maio, R., Castro, A., González, M., Cerecetto, H. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15: 2768.
- [46] Hernández, P., Tesis de Doctorado en Química en desarrollo: “Investigación y desarrollo de nuevas *N*-acilhidrazonas bioactivas”, Facultad de Química, Universidad de la República.
- [47] a) Merlino A., Tesis de Doctorado en Química en desarrollo: “Investigación y desarrollo de nuevos fármacos anti-*T. cruzi*: Inhibidores de cruzipaína derivados del sistema benzofuroxano y 1,3-dióxido de benzimidazol”, Facultad de Química, Universidad de la República. b) Development of second generation amidinohydrazones, thio- and semicarbazones as *Trypanosoma cruzi*-inhibitors bearing benzofuroxan and benzimidazole 1,3-dioxide core scaffolds. Merlino, A., Benitez, D., Chavez, S., Da Cunha, J., Hernández, P., Tinoco, L.W., Campillo, N.E., Páez, J.A., Cerecetto, H., González, M. *Med. Chem. Commun.* 2010, 1, 216-228.
- [48] <http://mestrelab.com/>
- [49] Peroxynitrite inactivates thiol-containing enzymes of *T. cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration. Rubbo, H., Denicola, A., Radi, R. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994, 308: 96.
- [50] Heterocyclic-2-carboxylic acid (3-cyano-1,4-di-*N*-oxide quinoxalin-2-yl) amide derivatives as hits for the development of neglected disease drugs. Ancizu, S., Moreno, E., Torres, E., Burguete, A., Pérez-Silanes S., Benítez, D., Villar, R., Solano B., Marín, A., Aldana, I., Cerecetto, H., González, M., Monge, A. *Molecules*, 2009, 14: 2256.
- [51] Evaluation of a new dendrimeric structure as prospective drugs carrier for intravenous administration of antichagasic active compounds. Fernandez, L., Calderón, M., Martinelli, M., Strumia, M., Cerecetto, H., González, M., Silber, J.J., Santo, M. *J. Phys. Org. Chem.* 2008, 21: 1079.
- [52] Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. Hinojosa Valdez, R., Düsman Tonin, L.T., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Morgado-Diaz, J.A., Sarragiotto, M., Vataru Nakamura, C. *Acta Tropica* 2009, 110: 7.
- [53] Activities of the triazole derivative SCH 56592 (Posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. Molina, J., Martins-Filho, O., Brener, Z., Romanha, A.J., Loebenberg, D., Urbina, J.A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44: 150.
- [54] Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Filardi, L.S., Brener, Z. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987, 81: 755.
- [55] Differences in Energy Metabolism Between Trypanosomatidae. Tielens, A.G.M., Van Hellemond, J.J. *Parasitol. Today*, 1998, 14: 265.