



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación del efecto del benznidazol en el metabolismo
antioxidante de *Trypanosoma cruzi*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

AKETZALLI SILVA CARMONA



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA
ASESOR TÉCNICO:
ZABDI A. GONZÁLEZ CHÁVEZ

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
Silva
Carmona
Aketzalli
67327433
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
410006537
2. Datos del tutor
Dra
Emma Cecilia
Saavedra
Lira
3. Datos del sinodal 1
Dr
Juan Carlos
Gallardo
Pérez
4. Datos sinodal 2
M en C
Alfonso José
Vilchis
Peluyera
5. Datos sinodal 3
Edén Marcela
Rodríguez
Flores
6. Datos sinodal 4
Dra
Laura
Kawasaki
Watanabe
7. Datos del trabajo escrito
Evaluación del efecto del benznidazol en el metabolismo antioxidante de
Trypanosoma cruzi
67 p
2016

Agradecimientos especiales

Este trabajo de investigación fue apoyado por el donativo de CONACyT 178638 y 264292 a nombre de la Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira.

Agradezco a la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad por permitirme ser beneficiaria del Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI).

Al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez a cada uno(a) de los doctores (a) y estudiantes que de una u otra forma ayudaron en mi formación académica y personal, por escucharme en los seminarios y siempre alentarme a seguir aprendiendo.

Agradecimientos

A mi tesoro más preciado: mi familia, a mis maravillosos y adorados padres por el apoyo y amor infinito e incondicional que sólo ustedes saben dar; a mis hermanitas, mi hermanito y a Esthercilla, gracias por el amor, la ayuda, las risas, las peleas y las oraciones de todos ustedes.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en particular a la Facultad de Ciencias por formarme académicamente y por darme la experiencia más grata de toda mi vida: ser universitaria azul y oro.

A la Dra. Emma Saavedra, por abrirme las puertas de su laboratorio, por la confianza y todos los consejos, gracias infinitas por haber creído en mí.

A mis maestros, a todos y cada uno de ellos, gracias por el apoyo, por la guía, por los consejos y sobre todo por ayudarme a alcanzar uno de mis más grandes sueños...ser BIÓLOGA.

Y por supuesto, mil gracias a mis amigos, a los de puerto, a los oaxaqueños y a los del D.F. gracias por quererme como soy, por soportarme como soy y por siempre estar.

A los chicos del laboratorio, gracias por la ayuda, la compañía y sobre todo gracias por los consejos durante todos estos años.

Dedicatorias

Este logro lo dedico a mis ángeles de amor: a mi mami y mi papi, a Lili, Daliux, Jesucito y Esthercilla. Todo lo que hago lo hago por ustedes y gracias a ustedes. No habría soportado, ni llegado a tanto de no ser por el amor y el apoyo incondicional que ustedes me dan.

ÍNDICE

Resumen.....	9
Abreviaturas.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Enfermedad de Chagas.....	13
1.1.1. Distribución y estadísticas.....	13
1.2. Agente causal de la enfermedad de Chagas.....	15
1.2.1. Clasificación Taxonómica.....	15
1.2.2. Características morfológicas.....	16
1.2.3. Ciclo de vida y distribución de <i>T. cruzi</i>	18
1.3. Mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas.....	20
1.4. Fases clínicas de la enfermedad.....	20
1.5. Diagnóstico y tratamiento.....	22
1.5.1. Modo de acción del benznidazol y del nifurtimox.....	24
1.6. Metabolismo antioxidante.....	26
2. ANTECEDENTES.....	30
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	32
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVOS.....	34
Objetivo general.....	34
Objetivos particulares.....	34
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	35
7. MÉTODOS.....	36

7.1. Cultivo de parásitos y crecimiento celular.....	36
7.2. Exposición a Bnz.....	37
7.3. Procesamiento de las muestras y determinación de metabolitos del sistema antioxidante.....	39
7.3.1. Cuantificación de proteína.....	40
7.4. Evaluación de la viabilidad de los parásitos por método colorimétrico.....	41
7.4.1. Evaluación de la viabilidad celular en exposiciones a Bnz.....	42
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
8.1. Características del crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> cepa Querétaro.....	43
8.2. Ensayos para determinar viabilidad por reducción de resazurina.....	45
8.2.1. Espectro de absorción de la resazurina.....	45
8.2.2. Condiciones para monitorear la reducción de la resazurina.....	46
8.2.3. Efectos del Bnz en el crecimiento y la viabilidad celular de <i>T. cruzi</i>	48
8.3. Cambios en el perfil de proteína en respuesta al Bnz.....	52
8.4. Concentración de metabolitos.....	54
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	60
10. CONCLUSIONES.....	62

11.PERSPECTIVAS.....	63
12.REFERENCIAS.....	64

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas, esta se considera como una de las 13 enfermedades infecciosas desatendidas y se estima que en el mundo existen 7 millones de personas infectadas por el parásito. Los fármacos que se utilizan para el tratamiento de la enfermedad son el Benznidazol (Bnz) y el Nifurtimox (Nfx); sin embargo estos compuestos son altamente tóxicos para el hospedero y su eficiencia no se ha comprobado en la fase crónica de la enfermedad.

Se propone que el modo de acción de estos fármacos es generar estrés oxidante por la formación de especies reactivas de oxígeno y/o metabolitos electrofílicos, los cuales se unen al grupo tiol de las biomoléculas. El principal metabolito antioxidante de *T. cruzi* es el tripanotión (T(SH)₂) y todo su sistema enzimático de desintoxicación de peróxidos es dependiente de dicho tiol.

En reportes previos se observó que en diferentes cepas y estadios de *T. cruzi* tratados con Bnz (50 y 100 μ M) y a tiempos cortos (6 y 2 horas respectivamente) ocurre una disminución del 80% en la concentración de T(SH)₂.

De igual modo, en la biotransformación del Bnz se observó que los aductos que se formaron en mayor proporción fueron con el T(SH)₂. El objetivo de este proyecto es analizar los efectos del Bnz en la dinámica del metabolismo antioxidante de *T. cruzi* en tiempos de exposición más largos para entender los mecanismos de defensa y resistencia de los parásitos a este fármaco.

Se cultivaron epimastigotes de la cepa Querétaro en dos condiciones de glucosa 2 y 12 mM, se expusieron durante 24 h a concentraciones de 15-160 μM de Bnz; las concentraciones de Bnz que inhiben al 50% el crecimiento de los parásitos (IC_{50}) fueron de 19 ± 2 y 27 ± 4 μM de Bnz, respectivamente, mientras que las dosis que matan el 50% de la población (LC_{50}) fueron de 61 ± 6 y 102 ± 9 μM en 2 y 12 mM de glucosa, respectivamente. Se determinó que a concentraciones mayores de 35 μM de Bnz se compromete la viabilidad de los parásitos.

En el rango de concentraciones inhibitorias del crecimiento celular las pozas de Cys y GSH fueron suficientes para mantener niveles de $\text{T}(\text{SH})_2$ necesarios que permitieran contender contra el estrés producido por el Bnz; sin embargo, en concentraciones letales del fármaco el sistema antioxidante puede estar rebasado debido a que las pozas de todos los tioles evaluados disminuyeron en más de un 70%.

En conclusión, las concentraciones de $\text{T}(\text{SH})_2$ y la posible facilidad de este para formar conjugados covalentes con el fármaco influye positivamente en la capacidad de los parásitos de contender contra el estrés ocasionado por el Bnz. Lo mismo ocurre con la disponibilidad de nutrientes debido a que en condiciones de mucha glucosa los parásitos cuentan con pozas de tioles más altas.

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
AdoMet:	S-adenosil Metionina
AdoMetDC	S-adenosil Metionina Descarboxilasa
ATP:	Trifosfato de Adenosina (siglas en inglés)
BSA:	Albúmina Sérica Bovina (siglas en inglés)
Bnz:	Benznidazol
Cys:	Cisteína
dAdoMet:	S-adenosil Metionina Descarboxilada
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DTNB	Ácido Dinitrobenzoico
DTT:	Ditiotreitol
TFA:	Ácido Trifluoroacético (siglas en inglés)
Glu:	Glucosa
Gly:	Glicina
GSSG:	Glutación (forma oxidada)
GSH:	Glutación Reducido
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (siglas en inglés)
LIT:	Medio de Infusión de Hígado y Triptosa (Liver Infusion Tryptose broth)
NADP ⁺ :	Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina Fosfato (forma oxidada).
NADPH:	Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina Fosfato (forma reducida).
ODC:	Ornitina Descarboxilasa
p/mL	parásitos/mililitro

PBS:	Buffer Salino de Fosfatos (siglas en inglés)
PCA:	Ácido Perclórico (siglas en inglés)
rpm:	revoluciones por minuto
SFB:	Suero Fetal Bovino
Spd:	Espermidina
SpdS:	Espermidina Sintasa
T(SH) ₂ :	Tripanotión
TryR:	Tripanotión Teductasa
TryS:	Tripanotión Sintetasa
TS ₂ :	Disulfuro de Tripanotión (forma oxidada)
γEC:	Gama Glutamil Cisteína
γ-ECS:	Gama Glutamil Cisteína Sintetasa

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Enfermedad de Chagas*

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una infección parasitaria, crónica y sistémica considerada como una de las 13 enfermedades tropicales infecciosas más olvidadas o desatendidas en el mundo, debido a que afecta principalmente a zonas marginadas y reciben poca atención por parte de los gobiernos y programas de salud ya que la población afectada carece principalmente de influencia política (Rassi, Rassi y Marin-Neto, 2010; OMS, 2016). Esta enfermedad es causada por el parásito intracelular obligado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), y fue descrita en 1909 por el médico de origen brasileño Carlos Chagas (1879-1934) (Chagas, 1909 en Rassi, Rassi y Marcondes de Rezende, 2012).

1.1.1 *Distribución y estadísticas*

La enfermedad de Chagas es un padecimiento endémico de 21 países de América Latina, distribuyéndose desde México hasta Argentina, aunque existen vectores y reservorios desde el sur de los Estados Unidos (Rassi, Rassi y Marcondes de Rezende, 2012). En 2015 se estimó que en América Latina 7 millones de personas padecen la enfermedad y otras 100 millones más viven en zonas de riesgo de contagio (WHO, 2015). Sin embargo, esta enfermedad ha tomado relevancia en los últimos años debido a que el número de casos de

tripanosomiasis en países no endémicos ha ido en aumento por procesos de migración humana.

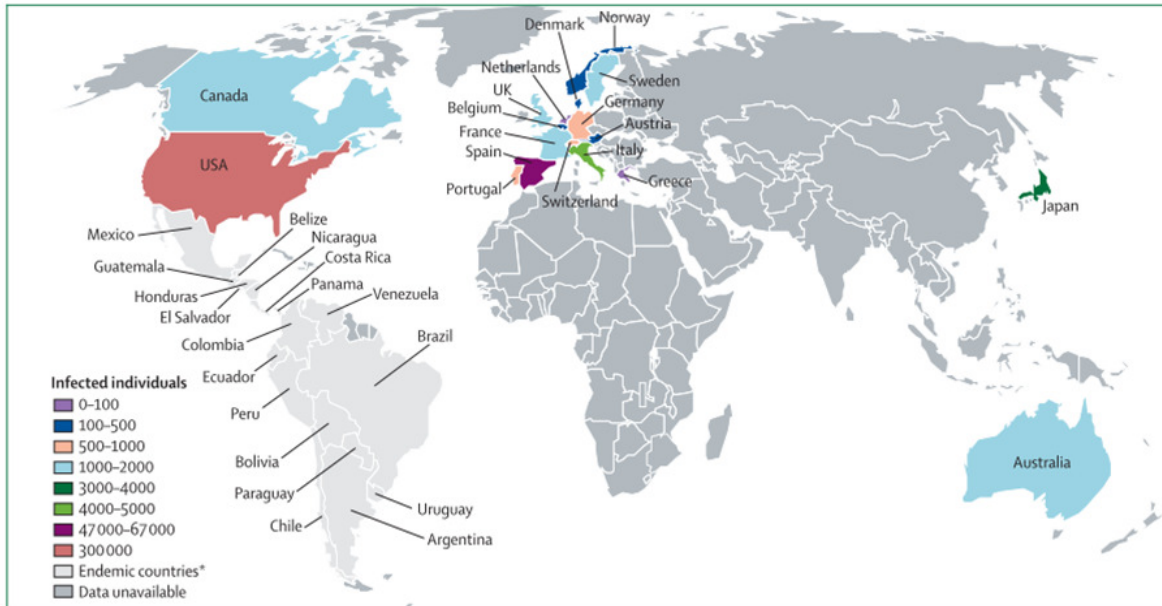


Figura 1.1. Distribución estimada de personas infectadas por *T. cruzi* que viven en países no endémicos de la enfermedad (Rassi, Rassi y Marin-Neto, 2010).

Como se muestra en la Figura 1.1, en 2005 se reportaron 300 mil casos en E.U. y 80 mil casos más en Europa. Esto indica que el problema ya no está confinado a su zona endémica y la enfermedad de Chagas se ha convertido en un problema para los sistemas de salud pública en varias partes del mundo (Rassi, Rassi y Marcondes de Rezende, 2012).

Las cifras de morbilidad y mortalidad de la enfermedad de Chagas sólo son aproximaciones debido a la falta de información epidemiológica precisa y por la dificultad de identificar a los individuos que se encuentran infectados en la fase asintomática de la infección (Flisser y Pérez, 2006).

1.2. Agente causal de la enfermedad de Chagas

1.2.1. Clasificación Taxonómica

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el protozoario *Trypanosoma cruzi* un parásito flagelado intracelular, tiene alto grado de variabilidad intraespecífica debido a su amplia distribución geográfica y a la diversidad de hospederos con lo que cuenta (Macedo et al., 2004).

La clasificación taxonómica de *T. cruzi* es la siguiente:

Dominio **Eukaryota**.

Reino **Protocista**.

Subreino **Protozoa**

Phylum **Sarcomastigophora**

Subphylum **Mastigophora**

Clase **Zoomastigophora**

Orden **Cinetoplastida**

Familia **Trypanosomatidae**

Género ***Trypanosoma***

Especie ***cruzi***

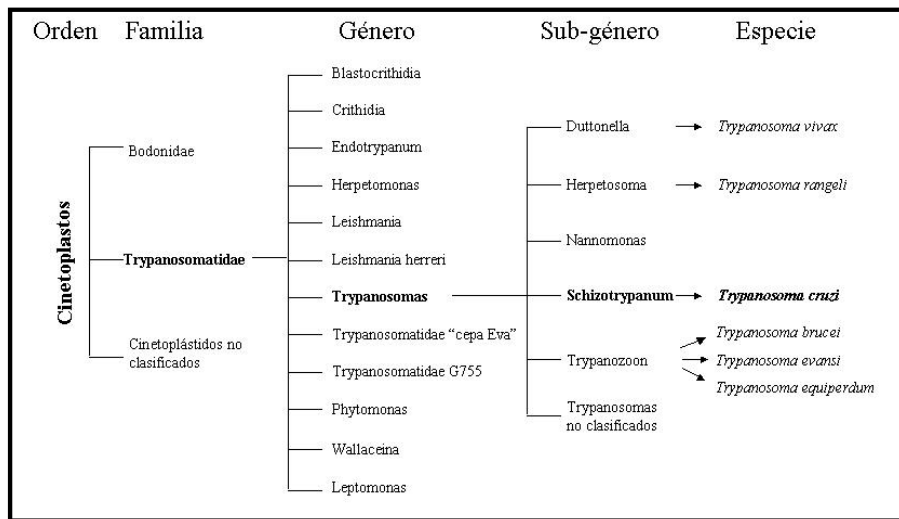


Figura 1.2. Cuadro taxonómico de *T. cruzi* y grupos hermanos. (Cevallos y Hernández, 2015).

Todos los miembros del orden cinetoplástida al que pertenece *T. cruzi* (Fig. 1.2.) se caracterizan por la presencia de un organelo llamado cinetoplasto. El cinetoplasto es una red compleja de ADN mitocondrial, la cual puede representar el 10 o el 20% del ADN celular total dependiendo de la especie (Cevallos y Hernández, 2015; Liu et al., 2005).

1.2.2. Características morfológicas

Los tres principales estadios morfológicos del parásito se distinguen entre sí por la posición del cinetoplasto en relación al núcleo y por la presencia o ausencia de una membrana ondulante (Cevallos y Hernández, 2015; Maya et al., 2007).

Dichos estadios morfológicos son (Fig.1.3):

Tripomastigote: fusiforme, 20 μm de longitud. El cinetoplasto se encuentra ubicado en la parte subterminal del parásito. El flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia adelante a lo largo del cuerpo del parásito, formando una membrana ondulante a lo largo de todo el parásito y emerge de forma libre en su extremo anterior. Constituyen las formas infectivas. Se encuentran en la sangre del hospedero vertebrado y en el intestino medio del triatómino. No son replicativos.

Epimastigote: también fusiforme con 20 μm de longitud. El cinetoplasto se encuentra localizado en la parte media del organismo, justo en la parte anterior al núcleo. El flagelo emerge de la parte media del parásito. Se dividen por fisión binaria en el intestino de los triatóminos.

Amastigote: Esférico de 2 μm de diámetro, sin flagelo libre. El cinetoplasto se observa como un cuerpo oscuro cerca del núcleo. Se multiplican intracelularmente por fisión binaria.

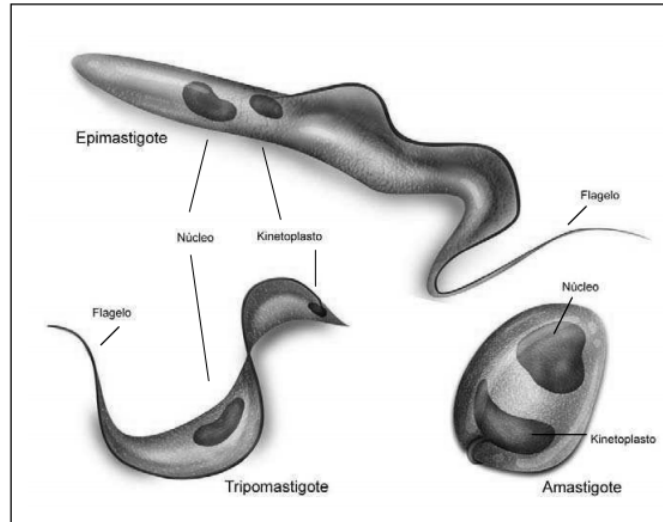


Figura 1.3. Estadios morfológicos de *T. cruzi* (Musikant, 2012).

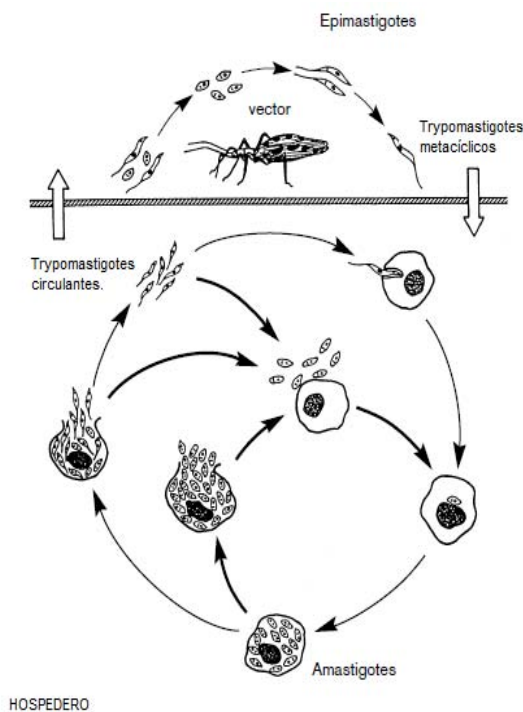
1.2.3. Ciclo de vida y distribución de *T. cruzi*

El género *Trypanosoma* se caracteriza por tener un huésped invertebrado y otro vertebrado para completar su ciclo de vida. Inicialmente un insecto triatómino hematófago, después de alimentarse defeca sobre el hospedero y junto con las heces y orina deposita las fases infectivas del parásito: tripomastigotes metacíclicos. El parásito puede penetrar al mamífero a través de la herida hecha por el insecto o por las mucosas.

Una vez dentro del hospedero vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células del tejido retículo-endotelial y conectivo donde se diferencian a amastigotes para replicarse por fisión binaria. Cuando la célula está llena de amastigotes, éstos se transforman a tripomastigotes, los cuales provocan la lisis de la célula hospedera debido al movimiento de los parásitos, y se convierten en las formas circulantes que invaden los tejidos adyacentes, diseminándose por la

vía linfática y el torrente sanguíneo (Rassi, Rassi y Marin-Neto, 2010). También puede ocurrir la lisis prematura de células infectadas con poblaciones heterogéneas de amastigotes y tripomastigotes (Tyler y Engman, 2001). El insecto se infecta con *T. cruzi* cuando se alimenta de la sangre del mamífero que contiene tripomastigotes circulantes.

En el tracto digestivo del vector, los tripomastigotes circulantes se diferencian a epimastigotes para replicarse, posteriormente los epimastigotes se transforman a tripomastigotes metacíclicos en la porción final del intestino. El ciclo de transmisión se completa cuando los insectos se alimentan y depositan los parásitos sobre los animales de los que se alimentan (Fig.1.4) (Rassi, Rassi y Marin-Neto, 2010).



El vector defeca en la herida que ocasiona al alimentarse e infecta al hospedero mamífero. Una vez dentro del hospedero los tripomastigotes metacíclicos infectan las células, es ahí donde se diferencian en amastigotes para replicarse. Al lisis de las células los tripomastigotes y amastigotes liberados van hacia torrente sanguíneo, infectan células adyacentes, o son ingeridos por insectos hematófagos. El triatómino se alimenta de sangre contaminada con tripomastigotes circulantes, una vez en la parte media del intestino del insecto se diferencian a epimastigotes, estos se transforman a tripomastigotes circulantes en la región terminal del intestino (Rassi, Rassi y Marin-Neto, 2010).

Figura 1.4. Ciclo de vida de *T. cruzi* (Rassi, Rassi y Marin-Neto, 2010).

1.3. Mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis americana se transmite a más de 150 especies de vertebrados, entre ellos el ser humano, por 32 especies de insectos hematófagos pertenecientes al phylum Arthropoda, subphylum Hexápoda, orden Hemíptera, familia Reduviidae y familia Triatominae (Rassi, Rassi y Marcondes de Rezende, 2012). *Triatoma dimidiata* y *T. barberi* son los vectores principales en México (Gorla y Noireau, 2010). Sin embargo, existen varios mecanismos de transmisión no vectoriales de la enfermedad: los principales mecanismos son transfusión con sangre contaminada, aunque en la actualidad se hacen pruebas de detección en bancos de sangre, y transmisión congénita de la madre infectada al feto; algunos otros son por trasplante de órganos, de manera oral por ingesta de alimentos y/o bebidas contaminadas con el parásito (Rassi, Rassi y Marcondes, 2012).

1.4. Fases clínicas de la enfermedad

La enfermedad de Chagas es una parasitosis crónica, y ocurre en dos fases: aguda y crónica.

Fase aguda: en la mayoría de los individuos es asintomática, sin embargo cuando hay síntomas éstos incluyen fiebres prolongadas, malestar generalizado; aumento en el tamaño del hígado, el bazo y nódulos linfáticos, y edemas subcutáneos. En el caso particular de transmisión por vector, se muestran signos de entrada de *T. cruzi* a través de la piel (Chagoma) o por membranas de la

mucosa ocular (signo de Romaña). La fase inicial de la infección dura entre 4 y 8 semanas.

Fase crónica: De 2 a 3 meses después de la infección inicial, alrededor de un 60 a 70% de los pacientes presentan la forma indeterminada de la fase crónica en la cual no hay síntomas clínicos. Para el otro 30 a 40% de las personas infectadas, la fase crónica persiste de por vida, llegando a presentar síntomas de 10 a 30 años después de la infección inicial, principalmente afecciones cardíacas y del aparato digestivo (esófago y colon). En México las manifestaciones cardíacas ocasionadas por *T. cruzi* son las más frecuentes (CENAPRECE SSA, 2015).

En la Figura 1.5 se ilustra el ciclo de vida de *T. cruzi* y el panorama general de los padecimientos que se ocasionan según la etapa de la infección.

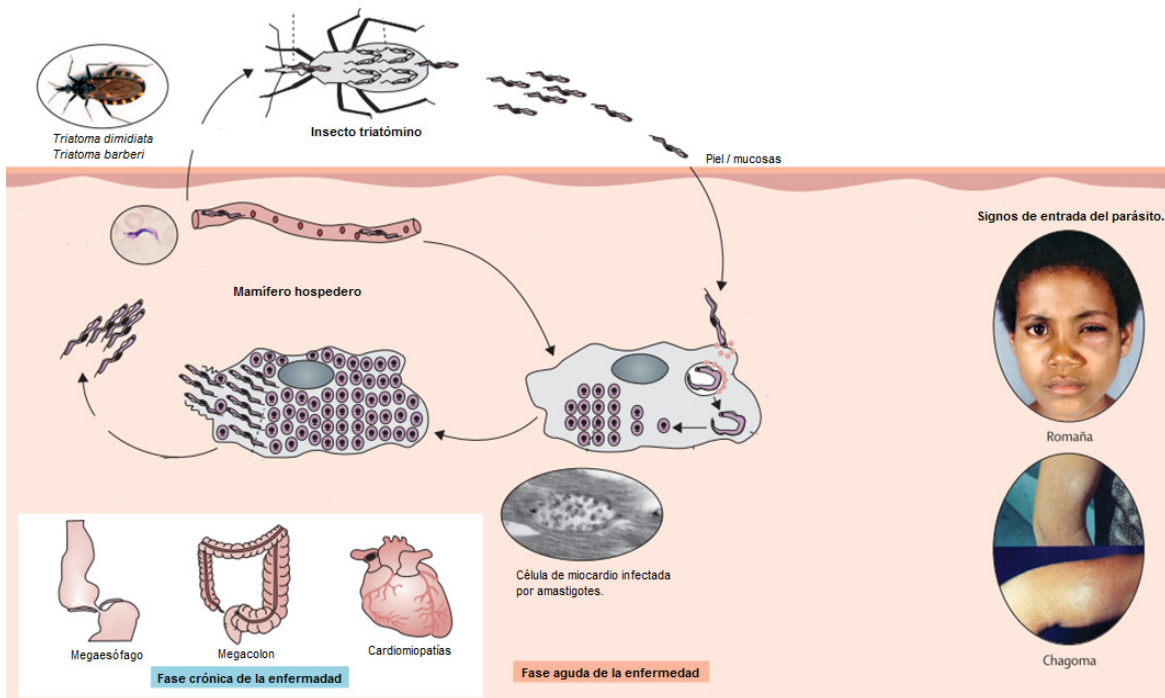


Figura 1.5. Panorama general de la enfermedad de Chagas. Ciclo de vida en la fase aguda de la enfermedad y los signos de entrada del parásito al hospedero. Complicaciones de distintos órganos en la fase crónica de la infección (Rassi, Rassi y Marin-Neto, 2010).

1.5. Diagnóstico y tratamiento

En el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se utilizan diferentes métodos parasitológicos e inmunológicos que consisten en evaluar la presencia del parásito y/o anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*.

En la fase aguda, el diagnóstico se basa en la detección del parásito mediante técnicas parasitológicas directas como la observación inmediata en el microscopio de muestras de sangre con técnicas de gota fresca de tinción de giemsa y/o frotis de gota gruesa. Por otra parte, existen métodos directos por concentración como el microhematocrito en capilar, técnica de Strout o por

tinciones de Giemsa de frotis sanguíneos en muestras de la capa leucocitaria. Las técnicas parasitológicas por expansión o amplificación incluyen hemocultivo, inoculación en ratón y/o amplificación de fragmentos de DNA del parásito por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos últimos métodos de amplificación son de uso preferente en investigación y en México son muy poco frecuentes como métodos de confirmación debido a los tiempos necesarios para obtener resultados y a su alto costo (CENAPRECE SSA, 2015).

En el caso de la fase crónica, debido a una parasitemia baja e intermitente el diagnóstico se basa en la detección serológica de inmunoglobulinas IgG específicas para antígenos de *T. cruzi*. La presencia de anticuerpos IgG contra antígenos de *T. cruzi* se debe detectar por al menos dos métodos serológicos distintos, entre ellos: ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI) ó hemaglutinación indirecta (HAI) (CENAPRECE SSA, 2015).

Los fármacos que se utilizan actualmente en la clínica para el tratamiento de la enfermedad son el benznidazol (N-bencil-2-nitroimidazol-1-acetamida; Bnz) un derivado del nitroimidazol y el nifurtimox (4[(5-nitrofurfurilideno) amino]-3-metiltiomorfolino-1,1-dioxido; Nfx) derivado del nitrofurano (Fig.1.6). El Bnz y el Nfx tienen un grupo nitro unido a un anillo de imidazol o a un furano, respectivamente. Las dosis recomendadas en la fase aguda son 5 mg/kg/día durante 60 días para el Bnz y de 8 a 10 mg/Kg/día por 60 a 90 días en el caso del Nfx. Sin embargo cuando la fase crónica reincide, el tratamiento puede llegar a durar hasta 5 meses o más (CENAPRECE SSA, 2015).

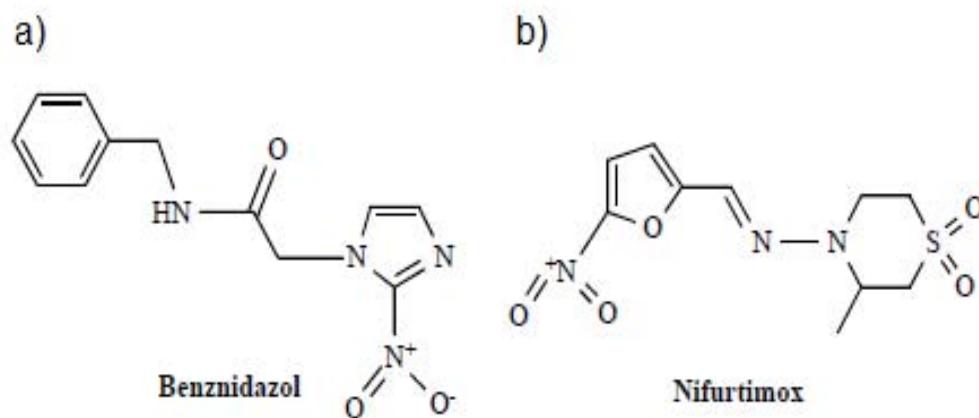


Figura 1.6. Estructura química de los fármacos utilizados en el tratamiento contra la infección por *T. cruzi*.

Los medicamentos sólo son eficientes en la fase aguda de la enfermedad (porcentaje de éxito del 81% (Rassi, Rassi y Marcondes de Rezende, 2012)) y generalmente causan efectos adversos como toxicidad sistémica y efectos secundarios, entre ellos anorexia, náuseas, vómito, dolor de cabeza, depresión en el sistema nervioso central, síntomas maniacos, convulsiones, vértigo, parestesias, polineuropatías periféricas y/o dermatitis (Kirchhoff, 2000).

1.5.1. Modo de acción del benznidazol y del nifurtimox

El modo de acción de los dos componentes nitroheterocíclicos es a través de la formación de varios intermediarios radicales libres o metabolitos electrofílicos mediante la reducción de su grupo nitro por la acción de nitroreductasas (Maya et al., 2007) (Fig.1.7).

El Bnz se descubrió como agente antitripanosomático a través de pruebas de detección, sin entender claramente su mecanismo de acción (Trochine et al., 2014). El Bnz es un pro-fármaco debido a que necesita ser metabolizado por el organismo para que pueda actuar; son los metabolitos reducidos del Bnz los que están involucrados en la formación de uniones covalentes con macromoléculas de la célula, por lo que se ha propuesto que su efecto tripanocida no depende de la generación de especies reactivas de oxígeno (Trochine et al., 2014).

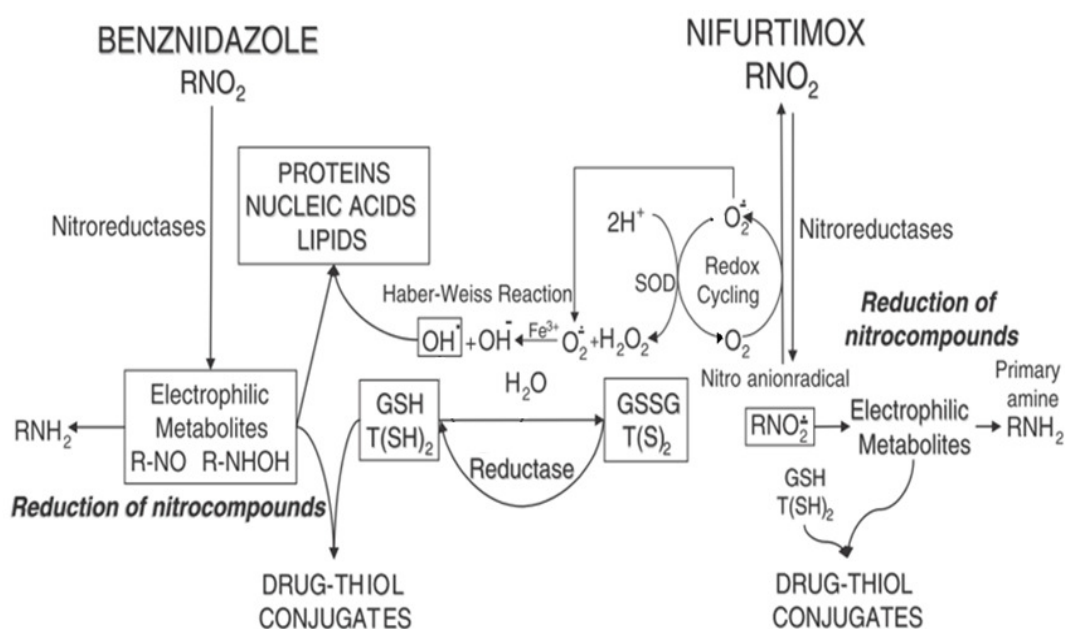


Figura 1.7. Función del tripanotión ($T(SH)_2$) y el glutatión (GSH) en el metabolismo de acción del Bnz y el Nfx. El grupo nitro de ambos fármacos se reduce a radicales libres o metabolitos electrofílicos por la acción de enzimas nitroreductasas. El $T(SH)_2$ y el GSH neutralizan los metabolitos derivados de los fármacos por la formación de conjugados derivados-tiol. Los radicales libres producidos por el Nfx se contrarrestan por la oxidación principalmente del $T(SH)_2$ (modificado de: Maya et al., 2007).

En el caso del Nfx, la NADPH citocromo P-450 reductasa actúa en el grupo R-NO, produciendo el intermediario anión radical nitro ($R-NO_2^-$). Este radical desencadena un ciclo redox con oxígeno molecular al reducir parcialmente al O_2 , regenerando el pro-fármaco y produciendo anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ en O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 generan ion hidroxilo (OH^-) y radical hidroxilo ($OH\cdot$) en presencia de Fe^{3+} . Finalmente es el $OH\cdot$ la especie reactiva de oxígeno que se une a proteínas, ácidos nucleicos y lípidos en la zona en la que se genera (Fig.1.7) (Maya et al., 2007).

1.6. Metabolismo antioxidante

En el metabolismo antioxidante de los tripanosomátidos, todo el sistema enzimático de desintoxicación de xenobióticos y peróxidos del parásito depende del tripanotión ($T(SH)_2$) (Olin-Sandoval, Moreno-Sánchez y Saavedra 2010).

El $T(SH)_2$ es un conjugado de dos moléculas de glutatión (GSH) unidas por una molécula de espermidina (Spd) (Fig1.8). Su síntesis depende de dos vías principales que son la síntesis y el transporte de GSH y poliaminas (Fig. 1.9) (Olin-Sandoval, Moreno-Sánchez, Saavedra 2010).

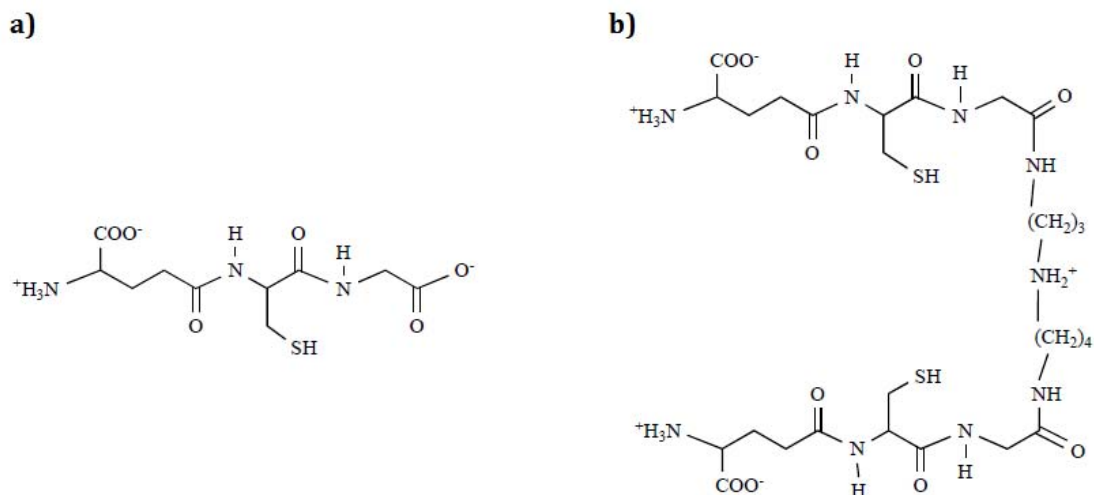


Figura 1.8. Principales tioles del metabolismo antioxidante de *T. cruzi*. **a)** GSH y **b)** T(SH)₂ constituido por dos moléculas de GSH unidas por una molécula de Spd.

Como se muestra en la Figura 1.9.a) para sintetizar el GSH, inicialmente la enzima gama glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS) cataliza la síntesis de γ -glutamylcisteína (γ -EC) a partir de glutamato (Glu) y cisteína (Cys) con consumo de ATP. La enzima glutatión sintetasa (GS) sintetiza al GSH al unir covalentemente una molécula de glicina (Gly) a una de γ -EC, consumiendo ATP.

Por otro lado, en la vía de síntesis de poliaminas, la Spd se sintetiza a partir de putrescina (Put) y S-adenosil metionina descarboxilada (dAdoMet) por la acción de la enzima espermidina sintasa (SpdS); en paralelo, la dAdoMet se sintetiza por la enzima s-adenosil metionina descarboxilasa (AdoMetDC) al descarboxilar una molécula de S-adenosil metionina (AdoMet). Al contrario de otros tripanosomátidos, no se ha reportado síntesis de Put en *T. cruzi* por la acción de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) (Persson, 2007).

La síntesis de $T(SH)_2$ se lleva a cabo por la enzima tripanotión sintetasa (TryS) al unir dos moléculas de GSH a una molécula de Spd con gasto de ATP. El $T(SH)_2$ dona sus electrones al sistema enzimático de desintoxicación de peróxidos, convirtiéndose así en disulfuro de tripanotión (TS_2). El TS_2 se regenera al reducirse por medio de la enzima tripanotión reductasa (TryR) tomando los equivalentes reductores del NADPH (Fig.1.9.b) (Olin-Sandoval, Moreno-Sánchez, Saavedra 2010).

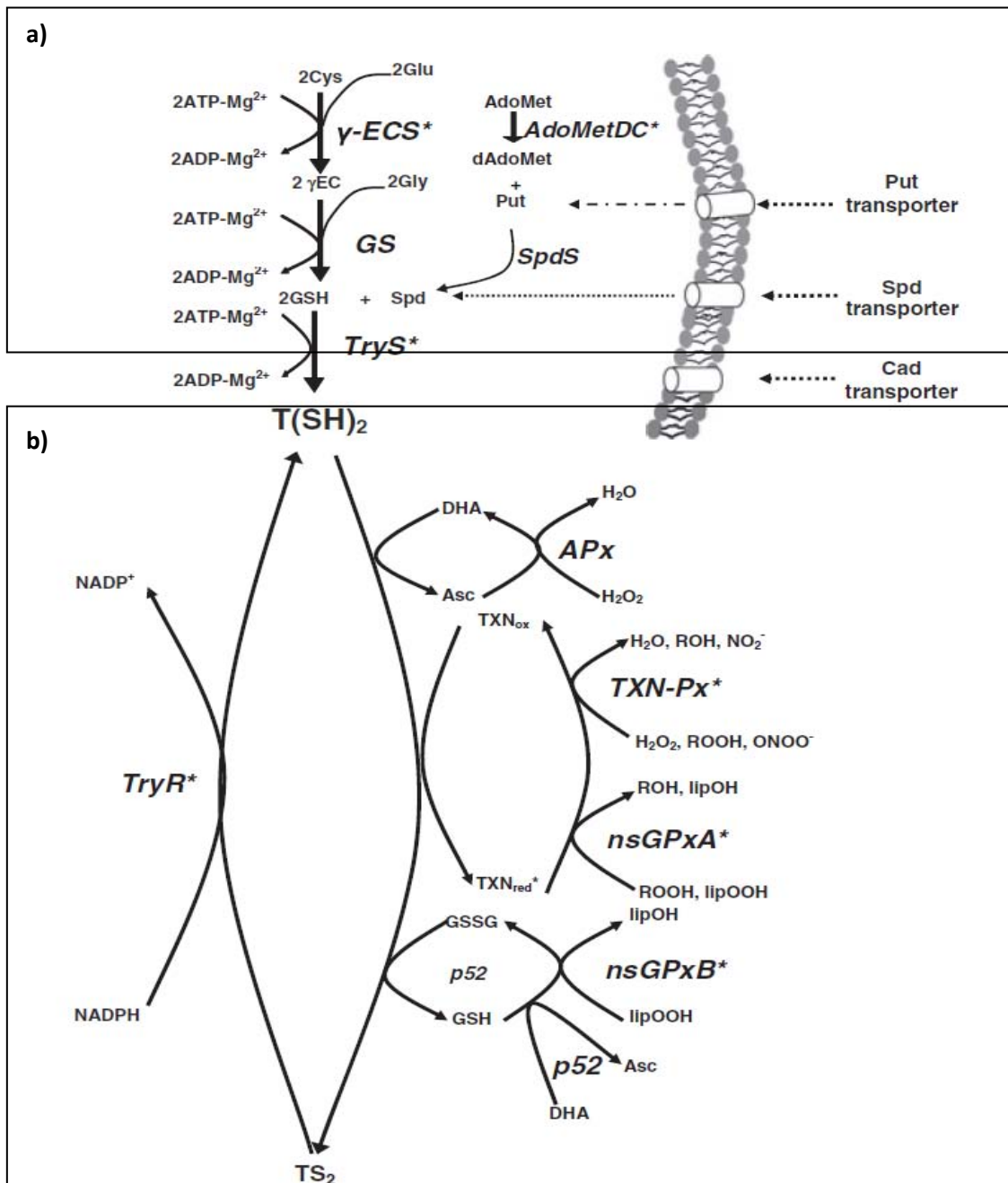


Figura 1.9. Metabolismo antioxidante de *T. cruzi*.

a) Vía de síntesis de $T(SH)_2$. b) consumo y regeneración del tripanotión (Olin-Sandoval, Moreno-Sánchez y Saavedra, 2010).

2. ANTECEDENTES

Estudios anteriores utilizando diferentes cepas y diferentes estadios (principalmente epimastigotes) de *T. cruzi* mostraron el efecto que tiene el Bnz en las concentraciones intracelulares de metabolitos con grupos tiol, principalmente a dosis únicas y a tiempos cortos de incubación (Repetto et al. 1996; Maya et al., 1997; Faundez et al, 2005).

Maya y colaboradores (1997) mostraron que con una dosis de 100 μM de Bnz durante 2 h se disminuyó en un 80% las pozas de T(SH)_2 en amastigotes, tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*. En 2014, Trochine et al., evaluaron las moléculas derivadas de la biotransformación del Bnz y su interacción con biomoléculas al exponer epimastigotes a 20 y 50 μM del fármaco durante 6 horas. Los aductos del fármaco que se formaron en mayor proporción fueron con el T(SH)_2 . Estos reportes señalan que el metabolismo antioxidante podría tener un papel relevante como el principal mecanismo de defensa de *T. cruzi* ante el estrés oxidante producido por los fármacos.

Aunque no se tienen reportes de exposiciones a Bnz durante más de 6 h Boiani et al. (2010) reportaron que en periodos de exposición a Nfx (7 μM) de 4 h la poza de tioles disminuye un 20% pero al analizar el efecto del fármaco en tratamientos prolongados (5 días) no se observaron diferencias en las moléculas con grupos tiol con respecto al control, lo que nos sugiere que en tiempos prolongados de exposición a fármacos, las pozas de tioles podrían tener la capacidad de recuperarse.

Sin embargo, no existe un estudio que analice de manera integral la respuesta al Bnz de todos los metabolitos precursores de la síntesis de T(SH)₂ de la vía metabólica antioxidante del parásito en células en crecimiento, así como sus cambios durante la transición a la muerte del parásito. Por lo tanto, es necesario realizar estudios adicionales para entender los mecanismos de acción del Bnz que nos puedan ayudar a dilucidar sus mecanismos citotóxicos, tanto hacia el parásito como en las células del hospedero.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, principalmente en zonas endémicas de la infección, muchas de las personas que llegan a los centros de salud con taquicardias o molestias no severas en el corazón son enviados a casa con la recomendación de “*no someterse a situaciones de estrés*”. Sin embargo, meses o años después se presentan a las unidades médicas debido a infartos ó cardiomiopatías severas y el diagnóstico en muchos de los casos es cardiopatía chagásica (Dr.Victor Acevedo. comunicación personal, julio 2014). Se dice que un adulto con enfermedad de Chagas es un niño que no fue diagnosticado ni tratado contra la infección de una manera apropiada (Altcheh, 2015).

La enfermedad de Chagas se considera como una de las 13 enfermedades infecciosas más olvidadas del mundo; ello a pesar de la estimación de 7 millones de personas infectadas con *T. cruzi* y otras 100 millones más que viven en zonas de riesgo de contraer la infección (WHO, 2015).

La terapia actual contra la enfermedad de Chagas con Bnz y Nfx tiene muchos inconvenientes: 1) los dos fármacos disponibles sólo son eficientes en la fase aguda de la enfermedad (81% de eficiencia) y no se tiene documentado el porcentaje de éxito en la etapa crónica de la enfermedad y 2) son muy tóxicos; producen efectos secundarios múltiples y severos, a tal grado que las personas prefieren abandonar el tratamiento.

Lamentablemente, muchas personas de zonas endémicas con alta prevalencia prefieren no saber si se encuentran infectados por *T. cruzi* y no se

someten a un diagnóstico, con el consecuente incremento en la infección peridoméstica (Salazar, 2015). De estos hechos parte la necesidad de buscar nuevos esquemas de tratamiento, nuevos fármacos o la búsqueda de blancos terapéuticos que sean más específicos aprovechando las diferencias del metabolismo antioxidante entre los parásitos y el hospedero humano.

Nuestro grupo de trabajo considera que es necesario el estudio de la dinámica del metabolismo antioxidante en respuesta al Bnz con la idea de entender los mecanismos de defensa con los que cuenta el parásito. Profundizar en el modo de acción de este fármaco nos puede ayudar a entender sus mecanismos citotóxicos y a replantear esquemas de tratamiento menos agresivos para la infección con *T. cruzi*.

4. HIPÓTESIS

En tiempos de exposición prolongados a Bnz, las pozas de tioles en *T. cruzi* tendrán un comportamiento dual: se mantendrá constante a concentraciones inhibitorias del crecimiento celular mientras que disminuirá a concentraciones que comprometen la viabilidad celular.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los cambios en las concentraciones de los metabolitos intermediarios del sistema antioxidante ante el estrés producido por el benznidazol en *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos particulares

- Caracterizar el crecimiento de epimastigotes de la cepa Querétaro de *T. cruzi*.
- Determinar las dosis de Bnz que inhiben al 50 y al 100% el crecimiento del parásito (IC₅₀ e IC₁₀₀).
- Determinar la dosis letal de Bnz en la cual se muere el 50% de la población (LC₅₀).
- Analizar la dinámica de tioles y poliaminas en extractos celulares de epimastigotes expuestos a concentraciones inhibitorias de crecimiento y concentraciones letales de Bnz.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

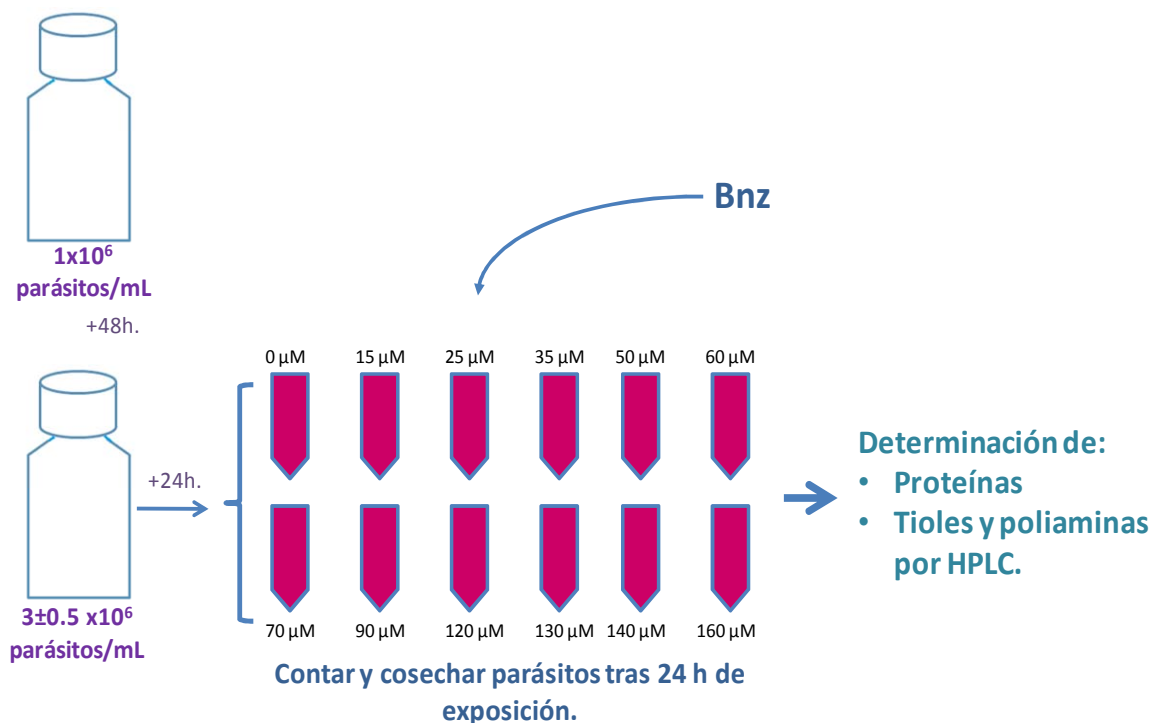


Figura 6.1 Estrategia experimental. El cultivo se inició con 1×10^6 parásitos/mL en un volumen total de 600 mL en frascos de 1 L a 28 °C, 48 h después el cultivo con una concentración de $3 \pm 0.5 \times 10^6$ parásitos /mL se distribuyó en tubos Falcon de 50 mL y se expusieron 25 mL de cultivo a diferentes concentraciones de Bnz durante 24 h, transcurrido este tiempo de incubación los parásitos se contaron y se cosecharon para cuantificar el contenido de proteínas y la concentración de tioles y poliaminas por HPLC.

7. MÉTODOS

7.1. Cultivo de parásitos y crecimiento celular

Los epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Querétaro se cultivaron en medio LIT (Liver Infusion Tryptose broth; DIFCO, Detroit, MI, EUA.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; ByProducts; Jalisco, México), 25 µg/ml de hemina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina y se incubaron a 28 °C.

Debido a que existen distintas condiciones para el cultivo de epimastigotes, se optó por explorar si el aporte adicional de glucosa tiene un efecto en la capacidad de contener contra el estrés provocado por el fármaco. Los experimentos se realizaron en dos condiciones de fuente de carbono, 0 y 10 mM de glucosa añadida. En ambas condiciones de cultivo se estableció la duración de la fase exponencial de crecimiento. Las curvas de crecimiento se iniciaron con 1, 3 y 5 x10⁶ parásitos/mL para la condición de 0 mM de glucosa, y con 1 x10⁶ parásitos/mL en la condición de 10 mM de glucosa añadida.

Las células de los cultivos se contaron cada 24 h hasta alcanzar la fase estacionaria. Los cálculos de la constante de velocidad de crecimiento (k) y el número de generaciones (g) se realizaron utilizando las formulas $k = \frac{2.303(\log N - \log N_0)}{t - t_0}$

y $g = \frac{t}{\tau}$ respectivamente.

7.2. Exposición a Bnz

Para evaluar el efecto del Bnz en el crecimiento, la viabilidad, la concentración de tioles y la concentración de poliaminas, se evaluaron concentraciones preliminares del fármaco para definir el rango de concentraciones que se utilizarían posteriormente para el análisis del metabolismo.

El protocolo experimental consistió en inocular 600 mL de medio LIT suplementado a una concentración de 1×10^6 parásitos/mL y se incubaron a 28°C durante 4 días en dos condiciones de fuente de carbono 0 y 10 mM de glucosa añadida. Las células del cultivo se contaron a las 24 y 48 horas. Después de este tiempo se expuso a los epimastigotes durante 24 h a concentraciones de 10 a 160 μM de Bnz (Sigma; St Louis MO, EUA) disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO). Transcurridas las 24 h de exposición a Bnz, los parásitos se contaron en cámaras de Neubauer para evaluar la sobrevivencia, tomando como criterio la movilidad de las células.

Para identificar las concentraciones a las cuales se inhibe el crecimiento en un 50 y en un 100 % (IC_{50} e IC_{100} respectivamente), se determinó la constante de crecimiento (k) de los parásitos crecidos en las distintas concentraciones de Bnz y se graficó en porcentaje tomando como el 100% la k obtenida en el cultivo sin el fármaco, sólo se tomaron en cuenta los cultivos en los que la concentración de parásitos fue mayor al del día de exposición.

Después de las 24 h de exposición a Bnz, los epimastigotes se cosecharon por centrifugación a 3500 rpm por 10 min y se lavaron con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM). Las muestras se congelaron en

nitrógeno líquido y se guardaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día de la determinación de metabolitos (Fig. 7.1).

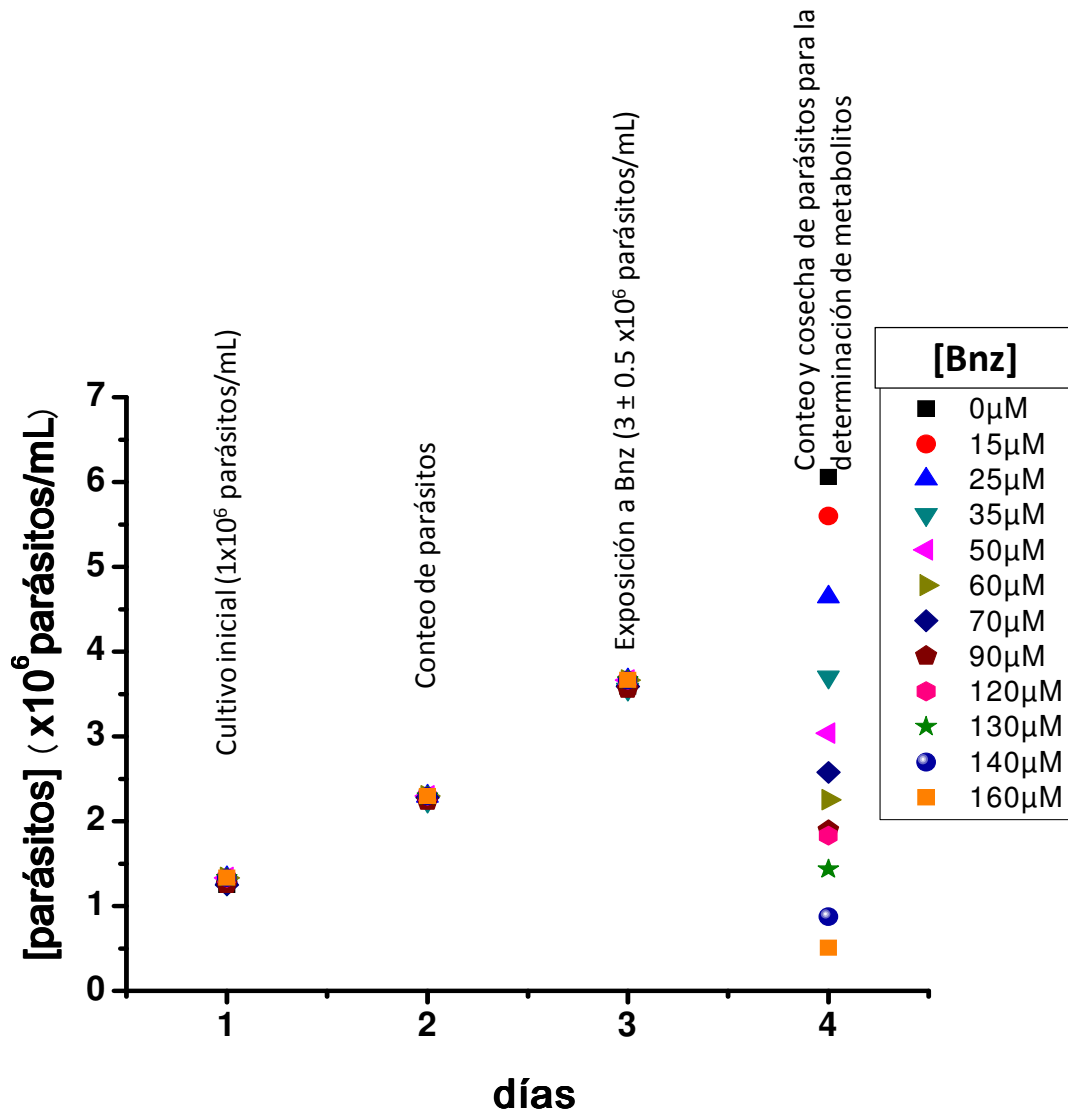


Figura 7.1. Protocolo de exposición a Bnz. Cambio en la concentración de parásitos en el tiempo y después de exponerlos a Bnz en el día 4 se observa la afectación que provoca el Bnz al número de parásitos.

7.3. Procesamiento de las muestras y determinación de metabolitos del sistema antioxidante

La determinación de las concentraciones de tioles (Cys, GSH y T(SH)₂) y poliaminas (Spd y Put); se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), haciendo algunas modificaciones a las metodologías estandarizadas en nuestro laboratorio (Olin-Sandoval et al, 2012). En todos los casos se utilizaron cultivos controles con DMSO sin Bnz.

Para la cuantificación del contenido de tioles, las pastillas de parásitos se resuspendieron en 90 µL de buffer de Lisis (HEPES 20 mM, EDTA 1 mM, KCl 0.15 mM pH 7.4) con 20 mM de DTT. Las células se rompieron con tres ciclos de congelación-descongelación. El lisado celular se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se recuperó y se redujeron los tioles con un exceso de borohidruro de sodio mediante una incubación en hielo durante 10 minutos.

Posteriormente, se adicionó ácido perclórico (PCA) a una concentración final de 3% para interrumpir la reacción de reducción y precipitar el contenido proteico. Las muestras se centrifugaron una vez más a 14000 rpm por 3 min, el sobrenadante se filtró a través de una membrana con poro de 0.45 µm y 20 µL de la muestra se analizaron por HPLC. La separación de tioles se realizó con una columna Altima HP C18 3µm 150 x 2.1 mm en fase reversa; la fase móvil que se utilizó fue una mezcla de acetonitrilo y TFA al 0.1%. Los tioles se derivatizaron con DTNB y se midió la absorbancia a 412 nm.

Para la determinación de las concentraciones de poliaminas, los parásitos se lisaron al resuspender la pastilla en 50 µL de buffer de Lisis con 1 mM de DTT

adicionado con 3% de PCA. El extracto citosólico se neutralizó con bicarbonato de sodio en polvo y se evaporó a 70 °C. El precipitado se resuspendió en una mezcla de 80 µL de HCl 0.05 N, 400 µL de bicarbonato de sodio 0.1 M pH 9.15 y se derivatizó con 800 µL de cloruro de dansilo 3 mM. Para el proceso de dansilación, las muestras se calentaron a 70 °C por 15 min en tubos de ensayo completamente protegidos de la luz e inmediatamente se congelaron a -20 °C hasta el día de la determinación. En el momento de la cuantificación con HPLC se descongelaron las muestras y se agregó 1 mL de metanol por cada 650 µL de muestra.

Posteriormente la muestra se filtró a través de una membrana para sustancias orgánicas con poro de 0.45 µm. Las poliaminas se separaron en la columna WatersSpherisorb 5µm 4.66 x 250 mm en fase reversa y utilizando la fase móvil de una mezcla de H₂O milliQ y metanol 40:60 respectivamente. Los metabolitos dansilados se detectaron por fluorescencia a 364 nm de excitación y 510 nm de emisión.

7.3.1. Cuantificación de proteína

Se cosecharon las células de 0.5 y 1 mL de los distintos cultivos de parásitos expuestos por 24 h a Bnz, se lavaron con PBS, se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min y se resuspendieron en 100 µL de solución A de Lowry (2% de NaCO₃, 0.4% de NaOH, 0.16% de tartrato de Na-K y 1% de SDS). Se lisaron con tres ciclos de congelación-descongelación y se cuantificaron por el método de Lowry (Lowry et al, 1951). Las muestras se leyeron espectrofotométricamente a 660 nm.

7.4. Evaluación de la viabilidad de los parásitos por método colorimétrico

Debido a que el criterio para evaluar la viabilidad en epimastigotes de *T. cruzi* es la movilidad, se optó por estandarizar un ensayo cuantitativo fundamentado en la detección de cambios colorimétricos por la reducción del colorante resazurina. El compuesto detecta el sistema enzimático oxidativo del parásito actuando como aceptor de electrones, de manera que existe una correlación directa entre la reducción de la resazurina y la viabilidad celular (Rolón et al, 2006; Liu, 1981).

Se evaluó el espectro de absorción de la resazurina oxidada (azul) y reducida (rosa) para identificar los picos de máxima absorción utilizando como blanco el medio LIT y la estabilidad del stock de resazurina. Posteriormente se elaboraron una serie de ensayos espectrofotométricos con el propósito de establecer las concentraciones de parásitos y de resazurina con las que se obtiene una relación lineal entre el número de parásitos/reducción de la resazurina. Se ensayaron concentraciones de 0, 10, 20, 35, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160 y 180 $\times 10^6$ parásitos/mL con periodos de incubación de 1, 2 y 4 horas a 28°C en concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 y 4 mM de resazurina en volúmenes de 1 mL en tubos de 1.5 mL. Las muestras se filtraron y se hicieron diluciones secuenciales hasta 1:100 en placas de 96 pozos en un volumen final de 200 μ L para no saturar la señal en el espectrofotómetro. Las lecturas se hicieron en un lector de placas tipo ELISA (BioRad, Hercules CA) a una longitud de onda de 595 nm.

7.4.1. Evaluación de la viabilidad celular en exposiciones a Bnz

El protocolo de exposición a Bnz se llevó a cabo como se describe en el apartado 7.2. Después de las 24 h de exposición al Bnz se centrifugaron 3 mL de cada cultivo expuesto a 3500 rpm durante 10 min. Los parásitos se trataron en 1 mL de medio LIT con 4 mM de resazurina a 28 °C durante 4 h en tubos de 1.5 mL. Después del periodo de incubación las muestras se centrifugaron 10 min a 14000 rpm, se tomaron 20 µL del sobrenadante y se llevaron a un volumen final de 200 µL en placas de 96 pozos. Las lecturas se hicieron en un lector de placas tipo ELISA a una longitud de onda de 595 nm.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

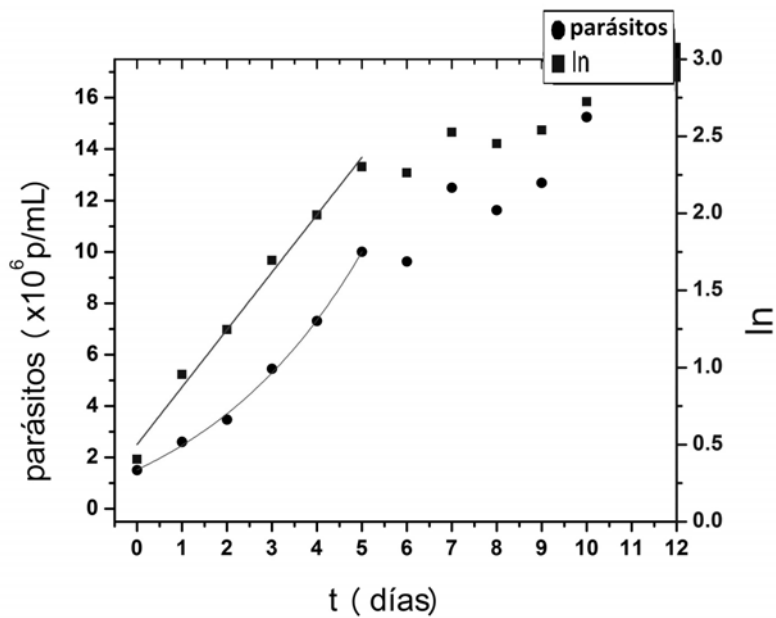
8.1. Características del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Querétaro

En primera instancia se evaluó si el crecimiento celular de epimastigotes de *T. cruzi* se ve afectado al cultivar los parásitos en dos condiciones de fuente de carbono 0 y 10 mM de glucosa añadida. Las concentraciones finales de glucosa en el medio fueron 2 y 12 mM debido al aporte de glucosa proveniente del suero fetal bovino y del extracto de levadura.

Como se observa en la Figura 8.1, la fase exponencial de crecimiento de los parásitos para ambas condiciones es de cinco días. Los parásitos cultivados en 2 mM de glucosa tienen un tiempo generacional de 34 h y una constante de crecimiento $k = 0.38 \pm 0.06 \text{ días}^{-1}$, mientras que los parásitos crecidos con 12 mM de glucosa, tienen un tiempo generacional de 19 horas y una $k = 0.7 \pm 1 \text{ días}^{-1}$ (Fig.8.1). La concentración de parásitos después de once días de cultivo con 2 mM de glucosa fue cinco veces menor y la k fue la mitad con respecto a la condición de 12 mM de glucosa.

Debido a que los parásitos crecidos en alta glucosa tenían seis veces más fuente de carbono, la expresión final de la utilización de moléculas simples por medio del metabolismo se reflejó en un mayor crecimiento, mientras que en la condición de 2 mM el compuesto orgánico como fuente de carbono era limitante (Madigan, Martinko y Parker, 2003).

A)



B)

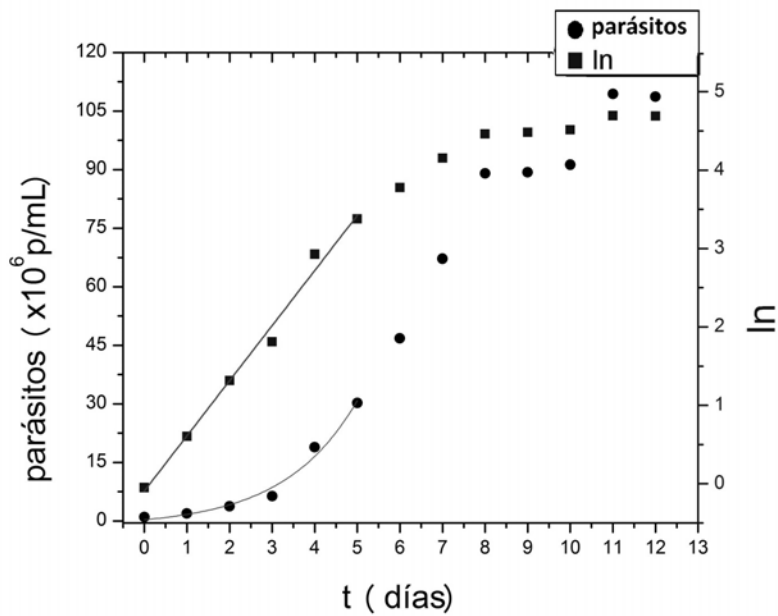


Figura 8.1. Crecimiento poblacional a través del tiempo 1×10^6 epimastigotes/mL iniciales se incubaron a 28°C en medio LIT suplementado en presencia de dos concentraciones de glucosa A) 2 mM y B) 12 mM. En esta gráfica se muestra en círculos la concentración de parásitos de un cultivo celular en el tiempo y en cuadros el logaritmo natural de la concentración de parásitos a través del tiempo.

8.2. Ensayos para determinar viabilidad por reducción de resazurina

En el campo de investigación de *T. cruzi* el criterio para medir la viabilidad celular es la movilidad de los parásitos, por lo tanto resulta un método un tanto subjetivo al evaluar muerte celular ocasionada por fármacos, además de ser un método tardado y poco práctico cuando se requieren analizar más de diez muestras como se hizo en este proyecto. Por ello se optó por estandarizar un método cuantitativo, rápido y confiable que permitiera procesar varias muestras (12) al mismo tiempo.

8.2.1 Espectro de absorción de la resazurina

En la determinación del espectro de absorción de la resazurina que se realizó para establecer los picos de máxima absorción del compuesto reducido (color rosa) se determinaron dos picos de absorción en las longitudes de onda de 537 y 571 nm, mientras que para la resazurina oxidada (color azul) el pico de máxima absorción fue en la longitud de onda de 609 nm (Fig. 8.2). Al identificar los picos de máxima absorción se estableció que las mediciones se realizarían a una longitud de onda de 595 nm ya que es la más cercana a los picos detectados de máxima absorción que el espectrofotómetro permite detectar.

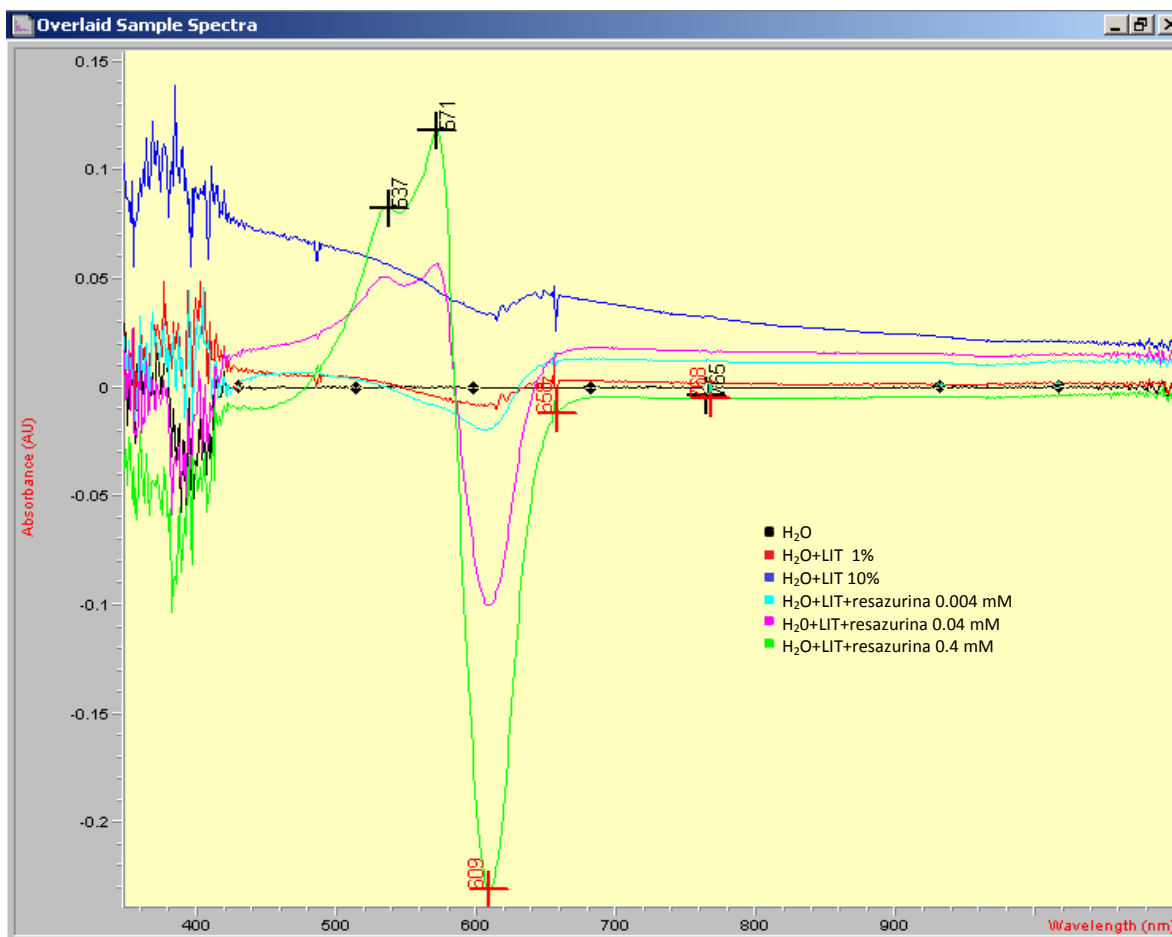


Figura 8.2. Espectro de absorción de la resazurina. Espectro de absorción del agua en negro (control), LIT y diferentes concentraciones de LIT+resazurina.

8.2.2. Condiciones para monitorear la reducción de la resazurina

Para establecer las condiciones de concentración de parásitos y de resazurina a utilizar en el que el intervalo de señal sea lineal, se evaluaron por movilidad, concentraciones de parásitos en un rango de $10 - 180 \times 10^6$ parásitos/mL y de 0.5 a 4 mM de resazurina en un volumen final de 1 mL. Las condiciones en las que se logró observar una relación lineal entre el número de parásitos y la reducción de la resazurina fueron en las concentraciones de 2 y 4

mM de resazurina (Fig.8.3B). La condición de 2 mM parece más lineal con excepción de un punto.

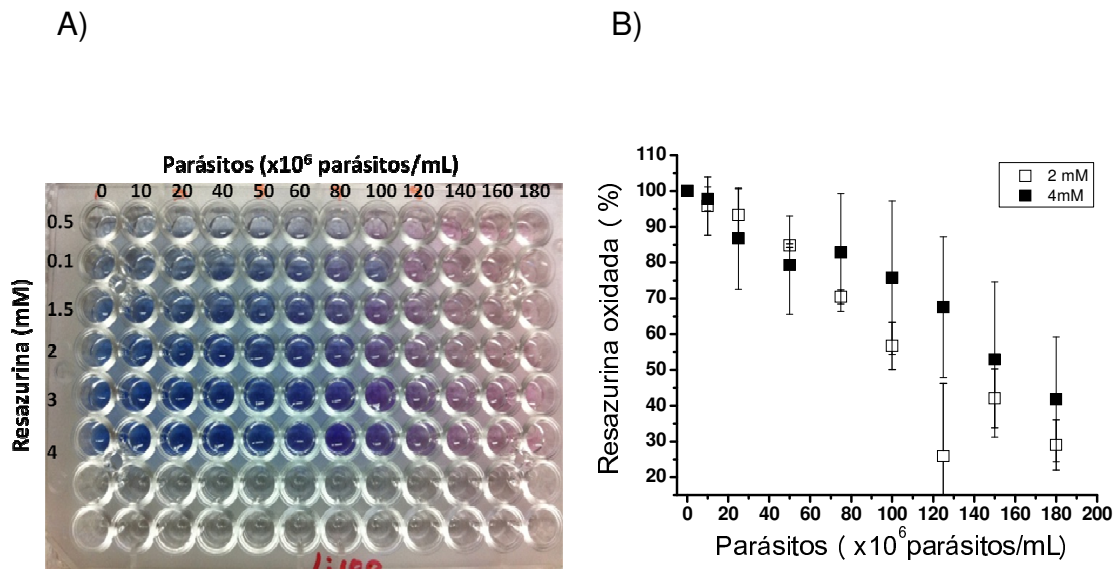


Figura 8.3. A) Placa de 96 pozos con concentraciones de parásitos crecientes (de 10 a 180 $\times 10^6$ parásitos/mL de izquierda a derecha) y concentraciones crecientes de resazurina (de 0.5 a 4 mM de arriba hacia abajo). Para no saturar la señal del espectrofotómetro se realizaron diluciones 1:100. B) Porcentaje de reducción de la resazurina al aumentar la concentración de parásitos en 2 y 4 mM de resazurina.

Al utilizar estos ensayos de viabilidad con los parásitos expuestos a Bnz durante 24 h, no se observaron cambios en el porcentaje de resazurina oxidada que se correlacionara con la disminución en la concentración de parásitos debido a las concentraciones crecientes de Bnz (Figura 8.4). No se realizaron más experimentos que explicaran este fenómeno debido a que no era el objetivo de este proyecto de tesis, sin embargo, se propone que el Bnz podría interferir con el ensayo, el método no es lo suficientemente sensible para detectar los cambios en la concentración de parásitos provocado por el fármaco o las concentraciones de

Bnz que se utilizaron eran muy altas. Por lo tanto, en este proyecto de investigación no se utilizó la detección de cambios colorimétricos con resazurina como parámetro de viabilidad. Las evaluaciones de viabilidad se realizaron por conteo de células móviles como se indica más adelante.

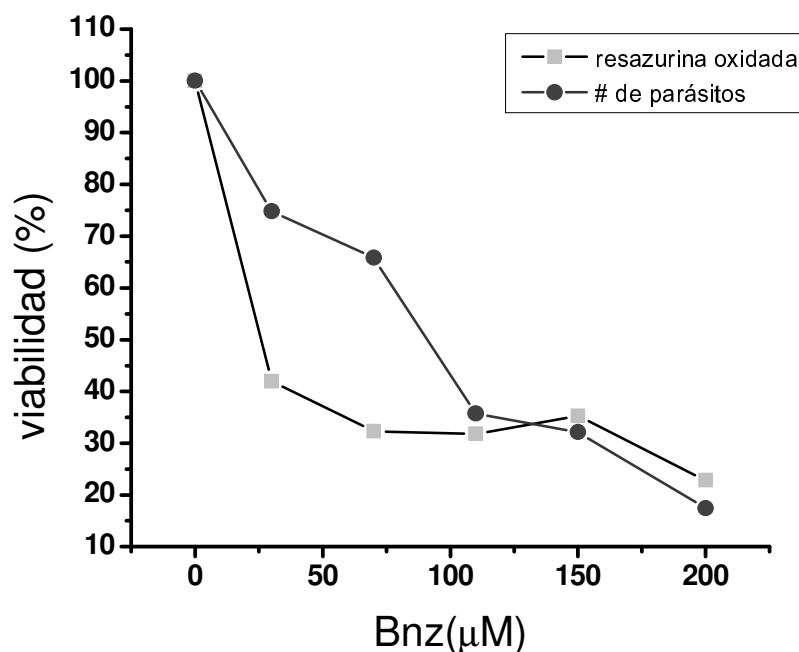


Figura 8.4. Evaluación de viabilidad en parásitos expuestos 24 h a Bnz e incubados 4 h con resazurina. No se observó una correlación entre la reducción de la resazurina por parásitos como parámetro de viabilidad y la disminución en la concentración de parásitos provocada por el Bnz.

8.2.3. Efectos del Bnz en el crecimiento y la viabilidad celular de *T. cruzi*

Para poder definir el intervalo de concentraciones de Bnz para las determinaciones del perfil de metabolitos se realizó una evaluación preliminar. El cultivo inicial se expuso al Bnz a una concentración promedio de $3.5 \pm 0.5 \times 10^6$ parásitos/mL en la fase exponencial de crecimiento. En la figura 8.5 se muestra el porcentaje de parásitos móviles después de 24 h de exposición al compuesto,

donde el 100% corresponde al número de parásitos del día de exposición (día 3) observándose que aproximadamente con 60 μM de Bnz se abate el crecimiento de los parásitos y concentraciones más altas resultan tóxicas. En todos los experimentos que se muestran en este trabajo el control 0 Bnz contiene un volumen de DMSO correspondiente al de la concentración más alta de Bnz añadida.

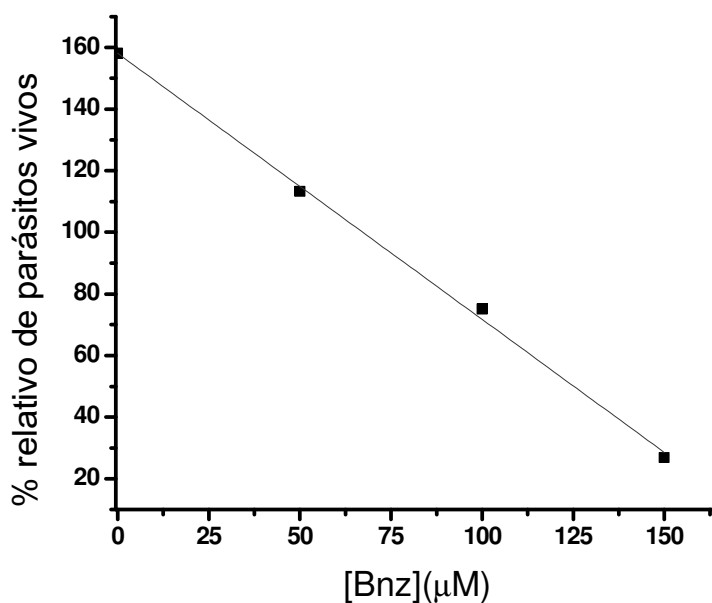


Figura 8.5. Porcentaje relativo de parásitos vivos expuestos hasta 150 μM de Bnz durante 24 h en medio LIT 2 mM de glucosa.

Con base en los resultados de la figura 8.5 se establecieron las concentraciones de Bnz para realizar los experimentos de este proyecto: 0, 15, 25, 35, 50, 60, 70, 90, 120, 130, 140 y 160 μM de Bnz, con lo que se logró seleccionar un diseño experimental que permitiera analizar un perfil con suficientes

concentraciones inhibitorias y letales para poder entender la dinámica del metabolismo antioxidante ante el estrés producido por exposiciones prolongadas (24 horas) a Bnz.

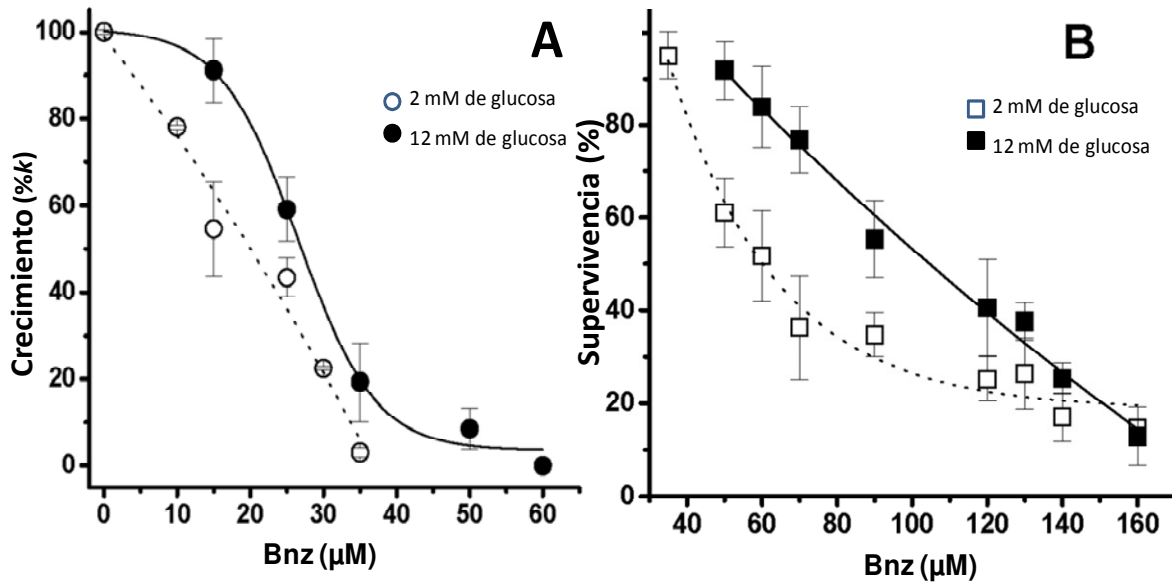


Figura 8.6. Parásitos expuestos a Bnz durante 24 h a 28 °C en medio LIT en dos condiciones de glucosa 2 y 12 mM. A) Porcentaje de tasas de crecimiento y B) porcentaje de parásitos vivos.

En la Figura 8.6A se muestra el efecto citostático que tiene el Bnz evaluado como la disminución en las constantes de crecimiento con respecto al control que sólo contiene DMSO y en la Fig. 8.6B se muestra el efecto tripanocida del Bnz al comparar el número de parásitos móviles (sobrevivencia) con las distintas concentraciones de Bnz, donde el 100% fue el número de parásitos a las 0 horas de exposición al fármaco. El patrón de disminución de las concentraciones de parásitos siempre fue más abrupto en la condición de 2 mM de glucosa.

Como se puede apreciar en la Tabla 8.1 los patrones de decaimiento concuerdan con los valores de IC_{50} y LC_{50} que mostraron diferencias estadísticamente significativas. La condición de 2 mM de glucosa mostró un valor 0.6 veces más bajo de LC_{50} que los crecidos en 12 mM de glucosa; sin embargo, no ocurrió lo mismo en las concentraciones correspondientes a la IC_{100} . Esto indica que la ventaja proporcionada por la glucosa en la capacidad de resistir al Bnz fue más evidente en las dosis letales del fármaco; es decir, en concentraciones mayores a la IC_{100} .

Tabla 8.1. Concentraciones de Bnz que inhiben el crecimiento celular en un 50% (IC_{50}) y un 100% (IC_{100}) y concentraciones que matan en un 50 % la población (LC_{50}) de epimastigotes de *T. cruzi*. * $p < 0.005$, ** $p < 0.001$, prueba *t*-Student. $n = 5$

BNZ (μ M)	2 mM glucosa	12 mM glucosa
IC_{50}	$19 \pm 2^*$	$27 \pm 4^*$
IC_{100}	36 ± 1	40 ± 7
LC_{50}	$61 \pm 6^{**}$	$102 \pm 9^{**}$

Los resultados sugieren que el estrés ocasionado por una baja concentración de nutrientes parece volver más susceptibles a los epimastigotes al Bnz, indicando que la disponibilidad adecuada de glucosa influye de manera positiva en la capacidad para contender contra el estrés producido por el fármaco.

La resistencia al Bnz observada en la condición de abundante glucosa se puede explicar por una mayor disponibilidad de esqueletos de carbono útiles para

la síntesis de precursores de moléculas con grupos tiol y/o un mejor abastecimiento de NADPH proveniente de la vía de las pentosas (Nelson y Cox, 2015).

8.3. Cambios en el perfil de proteína en respuesta al Bnz

En el perfil de proteína se observó que el patrón de disminución del contenido total de proteína por cultivo fue similar en ambas condiciones de fuente de carbono, y un comportamiento en el que a partir de 35 a 40 μM (IC_{100}) de Bnz el contenido de proteína total se mantuvo constante (Figura 8.7A), lo que no concordaba con la evaluación del efecto citotóxico donde sí se vio una disminución en el número de parásitos móviles en relación a las concentraciones del compuesto.

Debido a que después de la IC_{100} el contenido de proteína no cambió, se determinó la viabilidad de tres formas distintas en un mismo ensayo de exposición a Bnz: 1) contando únicamente los parásitos móviles, 2) sumando los parásitos móviles más los no móviles (parásitos totales) y 3) determinando la concentración de proteína (Figura 8.7B).

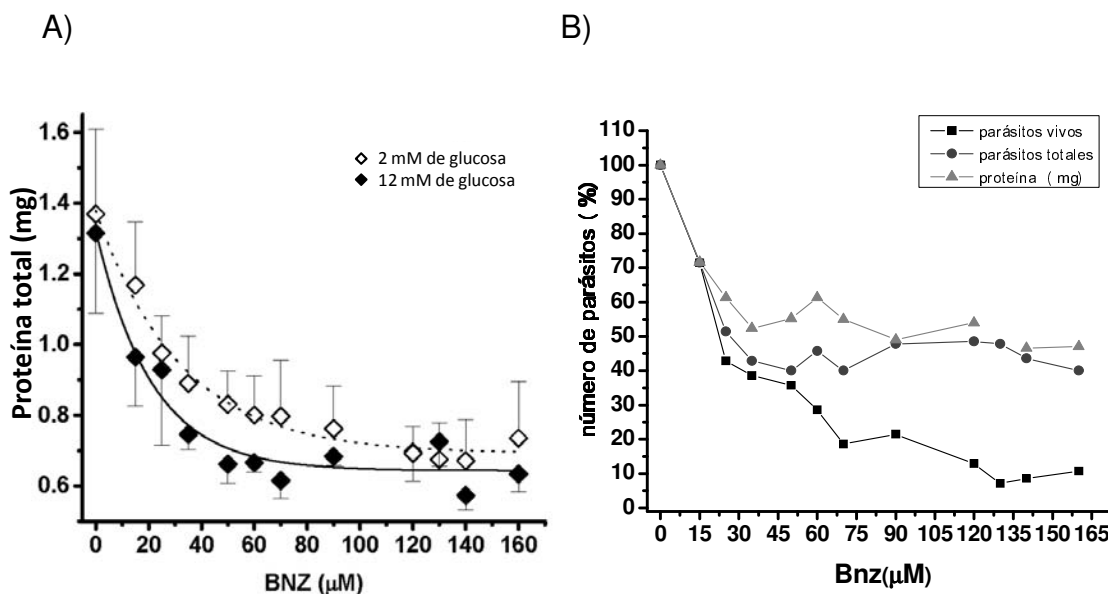


Figura 8.7. A) Curva dosis respuesta de la concentración de proteína tras 24 h de exposición a Bnz. La disminución en el contenido de proteína con respecto al control es más marcada en la condición de 12 mM. B) Correlación de parásitos móviles, parásitos totales (móviles + no móviles) y contenido de proteína respecto a distintas concentraciones de Bnz.

El número de parásitos móviles disminuyó conforme se aumentó la concentración de Bnz; sin embargo, la suma de parásitos móviles y no móviles se mantuvo constante a partir 35 μM de Bnz. En la evaluación de los parásitos totales se observó un comportamiento similar a la concentración de proteína, lo que sugiere que los parásitos se están muriendo pero no se lisan, y por lo tanto contribuyen en la cuantificación de proteína. Por esta razón las concentraciones de tioles y poliaminas se normalizaron por mg de proteína.

Con este experimento también se pudo observar que el rango de concentraciones en el que existe la división entre concentraciones que inhiben el crecimiento y las concentraciones letales va de entre 35 y 40 μM de Bnz.

8.4. Concentración de metabolitos

En la Figura 8.8, las gráficas A, B y C muestran las concentraciones intracelulares de tioles en los parásitos cultivados en 2 y 12 mM de glucosa y expuestos 24 h a Bnz.

Los parásitos controles cultivados en 2 mM de glucosa tienen menor concentración de tioles comparado con los crecidos en 12 mM de glucosa. Como se sabe, el carbono es el principal elemento de toda clase de macromoléculas y por lo tanto los parásitos en 12 mM de glucosa tendrían mayor disponibilidad de precursores para la síntesis de los tioles evaluados (Nelson y Cox, 2015).

El patrón de decremento de las concentraciones de Cys fue similar en ambas condiciones de cultivo en las distintas concentraciones de Bnz, aunque las concentraciones de cisteína siempre fueron menores en los parásitos de 2 mM de glucosa (Fig.8.8A).

El glutatión en los parásitos crecidos en 2 mM de glucosa disminuyó en la concentración de 15 μM de Bnz y se mantuvo así hasta los 70 μM ; por arriba de esta concentración el GSH bajó paulatinamente conforme aumentó la concentración de Bnz, lo que sugiere que después de la LC_{50} (61 μM) los parásitos no son capaces de mantener las concentraciones del principal precursor del T(SH)_2 y la viabilidad se ve muy comprometida porque en estas dosis letales la disminución tan evidente del GSH podría estar afectando otras funciones esenciales del GSH, como el metabolismo fierro-azufre de las metaloproteínas (Kumar et al.,2011).

Por otro lado, en los parásitos crecidos en 12 mM de glucosa el GSH se mantuvo constante hasta la concentración de 15 μM de Bnz; posteriormente, entre 25 y 50 μM del fármaco la concentración de GSH fue 30% menor con respecto al control y a concentraciones más altas de Bnz su poza disminuyó de forma similar que en la condición de 2 mM de glucosa (Fig.8.8B).

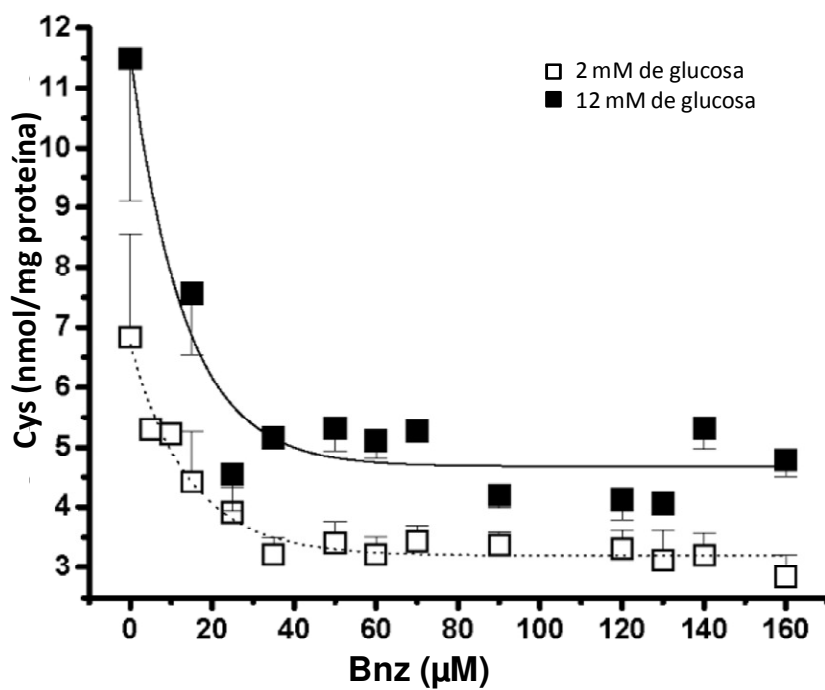
Con respecto a las pozas de T(SH)_2 , en la condición de 2 mM de fuente de carbono aumentaron aproximadamente 75% en la concentración de 25 μM de Bnz y se mantuvieron incrementadas en concentraciones inhibitorias del crecimiento celular de Bnz, pero disminuyeron progresivamente hasta agotarse casi por completo en concentraciones letales lo que parece indicar que en concentraciones de Bnz inhibitorias del crecimiento se estimula la síntesis de T(SH)_2 . Por otra parte, en parásitos cultivados en 12 mM de glucosa, los niveles de T(SH)_2 disminuyeron desde 15 μM de Bnz hasta agotarse a partir de 50 μM de Bnz (Fig.8.8C).

En el contexto de concentraciones de Bnz menores a la IC_{100} , los resultados de la disminución de la Cys pueden deberse a que su consumo aumenta para la síntesis de GSH. Gracias al consumo de Cys se mantienen o aumentan las concentraciones de GSH según la condición que se evalúe, que el GSH no disminuya o incluso aumente hace pensar que los conjugados tiol-droga no tengan mayor importancia en este rango de concentraciones inhibitorias. Por otro lado, en la condición de baja glucosa, la Cys y el GSH son suficientes para mantener el T(SH)_2 constante. En la condición de alta glucosa el T(SH)_2 disminuye y los

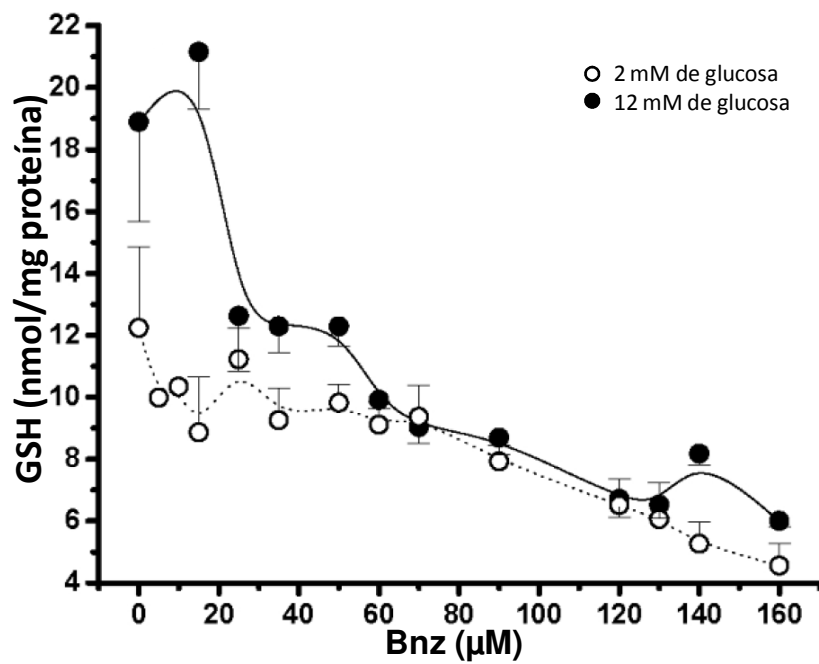
parásitos son más resistentes al fármaco. Estos efectos podrían indicar que su resistencia al Bnz puede depender de su habilidad para conjugar el $T(SH)_2$ con los xenobióticos.

Estos resultados sugieren que en el rango de concentraciones letales, la formación preferencial de conjugados entre los productos resultantes de la biotransformación del Bnz y las moléculas con grupos tiol provoca la disminución de las pozas de estos metabolitos. El agotamiento de las pozas de Cys y GSH provoca que ya no se pueda sintetizar $T(SH)_2$. En ambas condiciones de cultivo (2 y 12 mM de glucosa) se observó una disminución evidente en todas las pozas de tioles en el rango de concentraciones letales del fármaco, esto podría explicar que con 35 μM de Bnz es suficiente para disminuir los tioles, sobrepasando la capacidad del metabolismo antioxidante provocando muerte celular (Trochine et al., 2014).

A)



B)



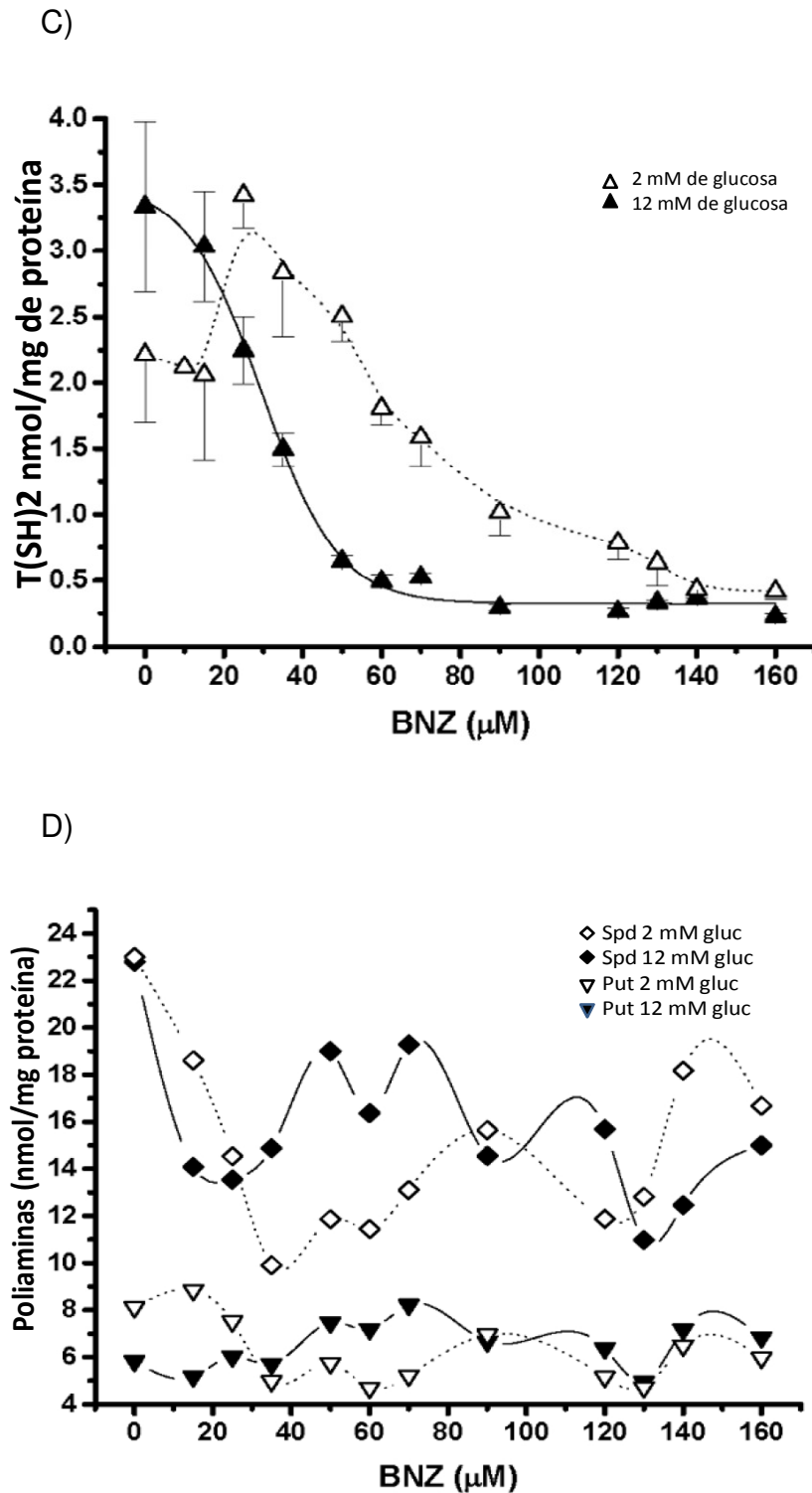


Figura 8.8. Perfil de metabolitos del sistema antioxidante de epimastigotes expuestos a diferentes concentraciones de Bnz durante 24 h. Los nmoles totales de los metabolitos se normalizaron por la concentración de proteína total. A) Cys, B) GSH, C) T(SH)₂ y D) poliaminas.

En la figura 8.8D se muestran las concentraciones de Spd y Put, donde se observa que en la condición de baja glucosa y hasta 35 μM de Bnz disminuye la poza de Spd y a partir de esta concentración empieza a aumentar, que es el rango donde el estrés parece sobrepasar el sistema antioxidante. Este aumento parece correlacionar con que la síntesis de T(SH)_2 probablemente se haya detenido, dando como resultado la acumulación de la Spd. En paralelo algo parecido sucedió en la condición de alta glucosa en donde la Spd disminuyó desde la concentración más baja de Bnz; sin embargo, la acumulación de Spd no fue evidente a concentraciones superiores, sino más bien mostró fluctuaciones entre los 50 y 160 μM de Bnz.

En ambos contextos de fuente de carbono, la Put parece no variar conforme aumentan las concentraciones de Bnz.

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En concentraciones inhibitorias del crecimiento las pozas de tioles (Cys, GSH y T(SH)₂) cambiaron diferencialmente con respecto al control según la concentración de glucosa disponible, pero parecen ser suficientes para contender contra el estrés producido por el Bnz; sin embargo, en concentraciones letales las concentraciones de tioles disminuyeron drásticamente hasta un 50% o menos sin importar la fuente de carbono, lo que podría significar que los tioles remanentes no son suficientes para conservar la viabilidad del parásito.

La disminución en las pozas de T(SH)₂ observadas en los parásitos de *T. cruzi* tratados con el Bnz a concentraciones mayores a 35 μM en ambas condiciones de fuente de carbono, puede deberse a los conjugados que se forman con el fármaco (Maya et al., 2007); sin embargo, la disminución en las pozas de Cys y GSH puede ser consecuencia de la formación de conjugados con la droga o del consumo de éstos para la síntesis de T(SH)₂. Por otro lado, la relación de más glucosa y más resistencia a la droga (Tabla 8.1) podría deberse a los esqueletos de carbono que la glucosa aporta para la síntesis de moléculas con grupos tiol, a la síntesis de NADPH proveniente de la vía de las pentosas y al ATP que se necesita para la síntesis de tioles (Nelson y Cox, 2015).

Los resultados de este proyecto sugieren que es más eficiente la conjugación entre el tripanotión y el Bnz que con otros tioles, a juzgar por la mayor pérdida de T(SH)₂ en comparación con el GSH, lo que parece indicar que es este metabolito el que principalmente protege al parásito del daño ocasionado por el

Bnz debido a las diferencias físico-químicas del T(SH)₂ con respecto a otros tioles, la formación del disulfuro se favorece por ser un ditiol y la carga positiva de la Spd le confiere más reactividad. Por lo tanto, una conjugación deficiente entre los tioles y el fármaco o sus derivados ya sea porque haya menor disponibilidad de moléculas con grupos tiol o porque haya menor poder reductor debido a que la concentración de NADPH sea limitante, podría ser la explicación de que los parásitos en la condición de baja glucosa sean más susceptibles. Esta hipótesis podría comprobarse con la evaluación en la concentración intracelular y extracelular de conjugados de tiol-fármaco.

Las diferencias en el patrón de disminución de las pozas de T(SH)₂ en la condición de 12 mM de glucosa, la disminución más rápida en el T(SH)₂ pero más resistencia al fármaco con respecto a la condición de 2 mM, sugieren un mecanismo enzimático que podría estar implicado en el proceso de desintoxicación de drogas además de sólo una interacción química (Vickers y Fairlamb, 2004) mecanismo que podría estar favorecido en la condición de 12 mM de glucosa debido a que hay más proteína (Fig.8.7A), porque hay más precursores para su síntesis.

En cuanto a la concentración intracelular de putrescina que se mantuvo constante y la tendencia en aumento de la Spd indican el papel fundamental que tienen los tioles en el proceso de desintoxicación de xenobióticos y un papel menor de las poliaminas en dicho proceso.

10. CONCLUSIONES

Una fuente deficiente de nutrientes de carbono puede afectar la capacidad de los epimastigotes *T. cruzi* de contener contra el estrés oxidativo ocasionado por el Bnz.

La eficiencia del metabolismo antioxidante para la desintoxicación del Bnz parece depender del T(SH)₂.

El perfil de metabolitos sugiere que en concentraciones menores a 35 μM de Bnz las pozas de Cys y GSH son suficientes para mantener las concentraciones de T(SH)₂ necesarias para contener contra el estrés producido por el Bnz lo que concuerda con la hipótesis antes planteada.

11. PERSPECTIVAS

Evaluar si los parásitos expuestos a concentraciones mayores de 35 μM de Bnz siguen metabólicamente activos.

Explorar si existe algún mecanismo enzimático de desintoxicación que promueva la conjugación de tioles con el fármaco.

Incubar a los parásitos con glucosa marcada radioactivamente para evaluar si la disminución en las moléculas con grupos tiol es ocasionada por la expulsión de los conjugados tiol-Bnz.

Determinar el perfil de enzimas del sistema antioxidante y analizar si existen cambios en sus actividades en respuesta al tratamiento con el fármaco, algo que ha sido poco estudiado en estos parásitos.

Estudiar si existen cambios a nivel transcripcional de las enzimas del metabolismo antioxidante en respuesta al tratamiento con el fármaco para identificar posibles mecanismos compensatorios de síntesis de novo de enzimas.

12. REFERENCIAS

- Altcheh, J. 2015. “Chagas Congénito” ponencia presentada en Cumbre Latinoamericana de la Enfermedad de Chagas, Ciudad de México, 17-18 julio del 2015.
- CENAPRECE, Secretaría de Salud. Manual de Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad de Chagas.[en línea]: México. 2013. [Fecha de consulta: octubre 2015]. Disponible en: www.cenaprece.salud.gob.mx
- Cevallos, A.M y Hernández, R. capítulo 15 *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana) En Martínez Romero, E. y Martínez Romero, J.C. (Ed.). *Microbios*. [en línea]. México, CIFN UNAM. Fecha de publicación desconocida. [citado 01-10-2015]. formato html. disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap15/>, ISBN 968-36-8879-9.
- Chagas, C. 1909. Nova trypanozomiase humana. Estudos sobre morfología e o ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homen. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1:159-218.
- Faundez, M., Pino, L., Letelier, L., Ortiz, C., López, R., Seguel, C., Ferreira, J., Pavani, M. and Morello, A. 2005. Buthionine Sulfoximine Increases the Toxicity of Nifurtimox and Benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother* 49(1):126-130.
- Flisser Steinbrunch, A. y Pérez Tamayo, R. 2006. *Aprendizaje de la Parasitología Basado en Problemas*. Editores de Textos Mexicanos, S.A. de C.V. México D.F. 614 p.
- Gorla, D. and Noireau, F. 2010. Geographic distribution of Triatominae vectors in América in Telleria, J. and Tibayrenc, M.Ed. American trypanosomiasis (Chagas disease). One hundred years of research. 1st edition. Burlington (VA): *Elsevier Inc*. p. 209-231.

- Kirchoff, L.V. 2000. American trypanosomiasis (Chagas` disease). In: Rakel, R.E. (Ed.) *Conn's Current Therapy. W.B. Saunders*, New York, pp. 101-102.
- Kumar, C., Igbaria, A., D'autreaux, B., Planson, A.G., Junot, C., Godat, E., Bachhawat, A.K., Delaunay-Moisan, A. y Toledano, M.B. 2011. Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO journal*.30, 2044-2056.
- Liu, D. 1981. A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol*. 26(2):145-149.
- Liu, B., Liu, Y., Motyka, S.A., Agbo, E.E.C. y Englund, P.T. 2005. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol*. 21(8): 363-9.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193(1): 265-275.
- Macedo, A.M., Machado, C.R., Oliveira, R.P. y Peña, S.D. 2004. Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 99:1-12.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. (2003). Brock Biología de los microorganismos. 10^{ed} España: PEARSON. 1096 pp.
- Maya, J.D., Cassels, B.K., Iturriaga-Vásquez, P. Ferreira, J., Faúndez, Mario., Norbel, Galanti., Ferreira, A., y Morello, A. 2007. Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host. *Comp. Biochem. Physiol*. 146: 601-620.
- Maya, J.D., Repetto, Y., Agosín, M., Ojeda, J.M., Tellez, R., Gaule, C. y Morello, A. 1997. Effects of Nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, tripomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 86: 101-106.
- Musikant, A.D. 2012. *La trans-sialidasa como factor de virulencia en la infección experimental con Trypanosoma cruzi*. (Tesis Doctoral, Facultad de

Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires). Recuperado de http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5303_Musikant.pdf.

- Nelson, L.D. y Cox, M.M. (2015). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6° ed. Freeman. USA. 1340pp.
- Olin-Sandoval, V., González-Chávez, Z., Berzunza-Cruz, M., Martínez, I., Jasso-Chávez, R., Becker, I., Espinoza, B., Moreno-Sánchez, R. y Saavedra, E. 2012. Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modelling. *FEBS J.* 279: 1811-1833.
- Olin-Sandoval, V. Moreno-Sánchez, Rafael y Saavedra, E. 2010. Targeting Trypanothione Metabolism in Trypanosomatid Human Parasites. *Curr. Drug Targets* (11) 11: 1-7.
- Organización Mundial de la Salud. (2016) ¿Por qué se les dice “desatendidas” a algunas enfermedades tropicales? Actualizada 19 enero 2012. Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/58/es/>
- Persson, L. 2007. Ornithine decarboxilase and S-adenosylmethionine decarboxylase in trypanosomatids. *Biochem Soc Trans.* 35: 317-17.
- Rassi, A. Jr, Rassi, A. y Marcondes de Rezende, J. 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin N Am* 26: 275-291.
- Rassi, A.Jr. Rassi, A. y Marin-Neto, J.A. 2010. Chagas Disease. *The Lancet.* 375: 1388-402.
- Repetto, Y., Agosin, M. and Morello, A. 1996. Glutathione and Trypanothione in Several Strains of *Trypanosoma cruzi*: Effect of Drugs. *Comp. Biochem. Physiol.* 115B(2):281-285.
- Rolón, M., Vega, C., Escario, J.A. y Gómez-Barrio, A. 2006. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res.* 99: 103-107.

- Salazar-Schettino P.M. (2015), "Chagas Agudo", ponencia presentada en la Cumbre Latinoamericana de la enfermedad de Chagas, Ciudad de México, 17-18 julio del 2015.
- Trochine, A., Creek, D.J., Faral-Tello, P., Barrett, M.P. y Robello, C. 2014. Benznidazole Biotransformation and Multiple Targets in *Trypanosoma cruzi* Reveled by Metabolomics. *PLoS Negl Trop Dis* 8(5): e2844.
- Tyler, K.M. y Engman, D.M. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* 31:472-481.
- Vickers, T.J. y Fairlamb, A.H. 2004. Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid elongation factor 1B. *J Biol Chem.* 279(26):27246-56.
- World Health Organization (2015) Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>