



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL BENZNIDAZOL Y DEL NIFURTIMOX EN EL METABOLISMO ANTIOXIDANTE DE *TRYPANOSOMA CRUZI*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
AKETZALLI SILVA CARMONA

TUTOR PRINCIPAL
EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA
[Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. WILHELM HANSBERG TORRES
[Instituto de Fisiología Celular](#)
DR. ROBERTO HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México. Enero 2020.



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.

Formato: mgt_4

Ficha de Graduado

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Apellido Paterno	Silva
Apellido Materno	Carmona
Nombre(s)	Aketzalli
Correo Electrónico	ketzi@ciencias.unam.mx
Teléfono de contacto	5531114995
Grado a obtener	Maestría
Título de la tesis (español)	Evaluación del efecto del Benznidazol y del Nifurtimox en el metabolismo antioxidante de <i>Trypanosoma cruzi</i> .
Título de la tesis (inglés)	Analysis of the effect of Benznidazole and Nifurtimox on the antioxidant metabolism of <i>Trypanosoma cruzi</i> .
Situación académica y/o laboral después de obtener el grado	Estudiante de Doctorado
Nombre completo del tutor	Saavedra Lira Emma Cecilia
Publicaciones	Publicaciones adicionales (colaboraciones, proyectos paralelos, etc.) Citlali Vázquez, Marlen Mejía-Tlachi, Zabdi González-Chávez, Aketzalli Silva, José Salud Rodríguez-Zavala, Rafael Moreno-Sánchez y Emma Saavedra. 2017. Buthionine sulfoximine is a multitarget inhibitor of trypanothione synthesis in <i>Trypanosoma cruzi</i> . FEBS Letters 591(23); 3881-3894.

PMDCB/2642/2018

Silva Carmona Aketzalli
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

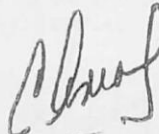
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 15 de octubre del presente año, revisaron su solicitud de **RATIFICACIÓN de JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Evaluación del efecto del Benznidazol y del Nifurtimox en el metabolismo antioxidante de Trypanosoma cruzi**", dirigida por el/la Dr(a). **Saavedra Lira Emma Cecilia**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Landa Piedra Abraham
VOCAL	Carrero Sánchez Julio César
VOCAL	Reyes Vivas Horacio
VOCAL	Cevallos Gaos Ana María
SECRETARIO	Pérez Montfort Ruy Enrique

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 15 de octubre de 2018.
COORDINADORA



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

contacto: mdcbq@posgrado.unam.mx Tel. 5623 7006

“...la ciencia sin ética forma tiranos, la ética sola hace fanáticos, y como universitario, es su deber y su derecho combatir la ignorancia, la propia y la ajena, con dignidad y grandeza...”

Fragmento de la toma de protesta de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Agradecimientos

Agradezco al CONACyT el haberme otorgado una beca (núm. de CVU. 662250) para la realización de mis estudios de maestría en el Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

Este trabajo de investigación fue apoyado por los donativos de CONACyT 178638, 264292, 272941 y 282663 a nombre de la Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira.

A cada uno(a) de los doctores (as) y estudiantes del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez que, de una u otra manera, ayudaron en mi formación académica y personal; por escucharme en los seminarios y siempre presionarme a seguir aprendiendo y explotar mi máximo potencial.

Al Dr. Roberto Hernández Fernández y al Dr. Wilhelm Hansberg Torres por sus valiosas observaciones y correcciones, por ayudar en el desarrollo de este proyecto con sus enriquecedoras aportaciones.

Y principalmente a mi tutora, la Dra. Emma C. Saavedra, por el apoyo incondicional, desde el inicio y hasta el último momento de este proyecto. Le estaré eternamente agradecida.

Dedicatoria

A mis padres Favy y Armando, gracias por tanto amor y tanto apoyo.

A mi familia, a la de sangre, a la de vida y experiencias, soy una mujer muy afortunada por tener una red de apoyo tan maravillosa e incondicional como ustedes. Esta etapa es por ustedes y para ustedes.

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas, considerada como una de las 13 enfermedades infecciosas desatendidas en el mundo; se estima que existen siete millones de personas infectadas por este parásito. El tratamiento actual contra la infección por *T. cruzi* consta del Benznidazol (Bnz) y del Nifurtimox (Nfx), fármacos reportados como tóxicos y poco eficientes en la fase crónica del padecimiento. En epimastigotes tratados por 2 o 6 horas con estos fármacos (50-100 μM) la concentración de tripanotión (T(SH)_2 , el principal metabolito antioxidante del parásito) disminuye un 80% debido a que la formación de aductos (uniones covalentes) en el fármaco, es principalmente con dicho metabolito. En este proyecto, se analizaron los efectos del Bnz y del Nfx en la dinámica del metabolismo antioxidante de *T. cruzi* en exposiciones de mayor duración, con respecto a lo reportado, para entender los mecanismos compensatorios de defensa y resistencia a estos xenobióticos.

Se expusieron epimastigotes de la cepa Querétaro por 24 horas a Bnz (1.5-30 μM) o a Nfx (1.5-15 μM) y se analizaron las concentraciones de los precursores del T(SH)_2 , así como las actividades enzimáticas y el flujo metabólico de reducción de peróxidos. Los valores de IC_{50} para el Bnz y el Nfx fueron 11 ± 3 y 3 ± 0.8 μM , respectivamente.

Con el Bnz, las concentraciones de glutatión total (GSH) aumentaron un 40-50% y el T(SH)_2 aumentó entre 30-40%. Por el contrario, con el Nfx, las concentraciones de T(SH)_2 disminuyeron entre un 20-40% en todas las concentraciones evaluadas. Las pozas de poliaminas no mostraron tendencias claras de cambio en presencia de ambos fármacos. El efecto de los fármacos en la actividad de las enzimas de la vía antioxidante fue inhibitorio para algunas de ellas. Los parásitos expuestos a Bnz presentaron inhibiciones de 40% en la triparedoxina (TXN) y la triparedoxina peroxidasa (TXNPx). Mientras que, los parásitos expuestos a Nfx presentaron una disminución del 40% en la glutatión sintetasa (GS) y la tripanotión reductasa (TryR) únicamente en la concentración de 15 μM . En cuanto a los flujos

metabólicos de reducción de peróxidos en la condición de Bnz, el flujo metabólico disminuyó hasta un 30% y en la condición de Nfx el flujo tiende a aumentar. Los resultados de este trabajo demuestran que el efecto de los fármacos en la dinámica del metabolismo antioxidante es diferente; por un lado, el Bnz actúa a través de la formación de conjugados covalentes con la TXN y no por el agotamiento del T(SH)₂, como sugiere la mayoría de la literatura. Por otro lado, el Nfx sí parece generar estrés oxidante a través de la disminución del T(SH)₂, por lo que el sistema de desintoxicación de peróxidos dependiente de dicho tiol tendría un papel central en el parásito para contender contra este fármaco.

CONTENIDO

CONTENIDO	9
ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Las parasitosis, un problema actual	13
1.2 Enfermedades Tropicales Desatendidas	13
1.3. Enfermedad de Chagas.....	14
1.3.1 Distribución y estadísticas.....	14
1.4. Agente causal de la enfermedad de Chagas	15
1.4.1. Clasificación Taxonómica	15
1.4.2. Características morfológicas	16
1.4.3. Ciclo de vida y distribución de <i>T. cruzi</i>	18
1.5. Mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas.....	20
1.6. Fases clínicas de la enfermedad	20
1.7. Diagnóstico	21
1.8. Tratamiento	22
1.8.1. Modo de acción del Benznidazol y del Nifurtimox	23
1.9. Metabolismo antioxidante en <i>T. cruzi</i>	25
2. ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PROYECTO	28
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	30
4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVO GENERAL	32
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	33
7. MÉTODOS.....	34
7.1 Condiciones de cultivo y características del crecimiento celular de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> de la cepa Querétaro	34
7.2. Exposición a los fármacos	35
7.3. Determinación de los metabolitos intermediarios del sistema antioxidante.....	36
7.4 Determinación de las actividades de las enzimas del metabolismo antioxidante	37
7.5. Evaluación del flujo metabólico de reducción de peróxidos	41
7.6. Purificación de enzimas recombinantes.....	41
7.7. Cuantificación de proteína	42
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44

8.1 Validación del criterio de viabilidad celular de <i>T. cruzi</i>	44
8.2 Efecto de los fármacos en el crecimiento de los parásitos	46
8.3 Perfil de tioles en parásitos expuestos a los fármacos.....	49
8.4 Dinámica de tioles en tiempos cortos de exposición a Bnz	53
8.5 Efecto de los fármacos en las pozas de poliaminas	56
8.6 Efecto del tratamiento con los fármacos en las actividades enzimáticas de la vía metabólica antioxidante en el parásito.....	58
8.7 Efecto del tratamiento de los fármacos en el flujo de reducción de peróxidos	60
9. CONCLUSIONES GENERALES.....	64
10. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO.....	67
11. REFERENCIAS	69

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Difosfato De Adenosina (siglas en inglés)
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
cumOOH	Hidroperóxido de Cumeno
dAdoMet	S-adenosil Metionina Descarboxilada
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DTNB	Ácido Dinitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
ERNs	Especies Reactivas de Nitrógeno
Glu	Glucosa
Gly	Glicina
GS	Glutación Sintetasa
GSSG	Glutación (forma oxidada)
GSH	Glutación reducido
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (siglas en inglés)
LDH	Lactato Deshidrogenasa
LIT	Medio de Infusión de Hígado y Triptosa (siglas en inglés)
NADP ⁺	Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina Fosfato (forma oxidada)
NADPH	Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina Fosfato (forma reducida)
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma oxidada)

NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma reducida)
ODC	Ornitina Descarboxilasa
p/mL	parásitos/mililitro
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos (siglas en inglés)
PCA	Ácido Perclórico (siglas en inglés)
PEP	Fosfoenolpiruvato
PK	Piruvato Cinasa
pyr	piruvato
SFB	Suero Fetal Bovino
Spd	Espermidina
SpdS	Espermidina Sintasa
T.A.	Temperatura Ambiente
T(SH) ₂	Tripanotión (forma reducida)
TFA	Ácido Trifluoroacético (siglas en inglés)
TryR	Tripanotión Reductasa
TryS	Tripanotión Sintetasa
TS ₂	Disulfuro de Tripanotión (forma oxidada)
TXN	Triparedoxina
TXNPx	Triparedoxina Peroxidasa
x g	Fuerza centrífuga relativa
γEC	Gama-glutamilcisteína
γ-ECS	Gama-glutamilcisteína sintetasa

INTRODUCCIÓN

1.1 Las parasitosis, un problema actual

El parasitismo es un tipo de predación en donde el organismo parásito obtiene sus nutrientes de uno o unos pocos individuos hospederos, provocándoles daño, pero sin causarles necesariamente una muerte inmediata (Begon et al., 1988). Los patógenos y las enfermedades que causan, representan una fuente importante de mortalidad y disminución en la fecundidad en muchas poblaciones en estado natural, humanas, de animales domésticos y cultivos (Begon et al., 1988).

Las interacciones entre organismos generan procesos de selección natural; de esta manera, cabe esperar que las actividades de los parásitos influyan sobre la evolución de sus huéspedes y viceversa. Si se asume que el proceso de evolución es en gran parte consecuencia de las interacciones entre los organismos (tal como suponía Darwin), podemos esperar que los procesos ecológicos y evolutivos entre parásitos y hospederos se presenten íntimamente relacionados (Begon et al., 1988), lo que nos explicaría por qué a las poblaciones de hospederos de *T. cruzi*, los parásitos no les provocan una muerte inmediata.

1.2 Enfermedades Tropicales Desatendidas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió a un conjunto de 13 enfermedades infecciosas como enfermedades tropicales desatendidas, muchas de ellas parasitarias provocadas por un grupo biológicamente diverso de patógenos. Se caracterizan por ser padecimientos crónicos que se desarrollan lentamente causando daños irreversibles y discapacidades, lo que muchas veces provoca estigmatización y exclusión social. Comprometen el desarrollo físico y cognitivo de los individuos, contribuye a enfermedades secundarias a la infección, muerte materno-infantil y limita la productividad económica.

La incidencia persiste en un estrato importante de la población afectando a más de mil millones de personas en el mundo, principalmente a poblaciones con acceso limitado a servicios de salud en áreas rurales remotas con altos niveles de pobreza, que reciben poca o nula atención por parte de sus gobiernos y no son prioritarias en sistemas de salud pública debido a que carecen de influencia política. Se asocian a insalubridad del agua y a condiciones precarias de vivienda y saneamiento básico (OMS, 2018).

1.3. 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 desatendidas en el mundo. La causa de esta enfermedad es el parásito intracelular obligado *Trypanosoma cruzi*, y fue descrita en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas (1879-1934) (Chagas, 1909).

1.3.1 Distribución y estadísticas

La enfermedad de Chagas es un padecimiento endémico de 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 2018 se estimó que en América Latina 7 millones de personas padecían la enfermedad y otras 100 millones vivían en zonas de riesgo de contagio (WHO, 2018). 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).

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. La figura 1.1 muestra el número de personas infectadas en diferentes regiones del mundo, 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 (Schmunis, 2007).

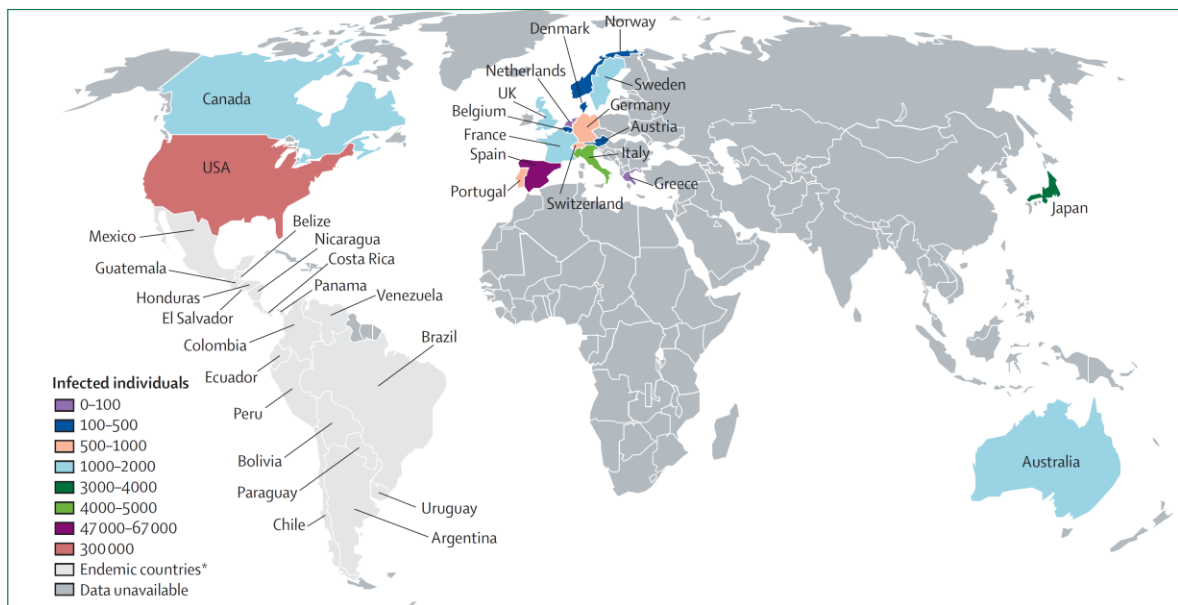


Figura 1.1. Distribución estimada de personas infectadas por *T. cruzi* que viven en países no endémicos de la enfermedad (Rassi, Rassi y Marin-Neto, 2010).

1.4. Agente causal de la enfermedad de Chagas

1.4.1. Clasificación Taxonómica

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el protozooario *T. cruzi*. Este es un parásito flagelado intracelular que tiene un alto grado de variabilidad intraespecífica debido a su amplia distribución geográfica y a la diversidad de hospederos con los 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***

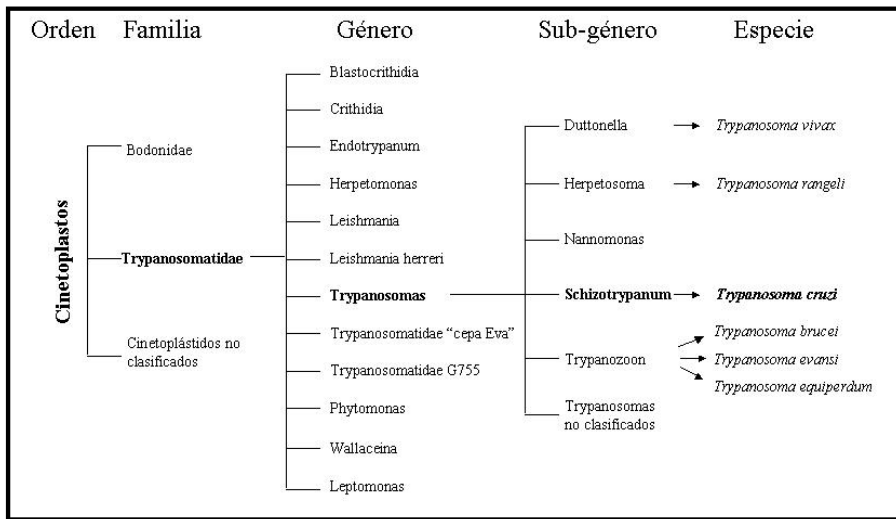


Figura 1.2. Cuadro taxonómico de *T. cruzi* y grupos hermanos (Cevallos y Hernández, 2015).

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, el cual puede representar entre el 10 y el 20% del ADN celular total dependiendo de la especie (Cevallos y Hernández, 2015; Liu et al., 2005).

1.4.2. 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 organismo, formando una membrana ondulante a lo largo de todo el parásito y emerge de forma libre en su extremo anterior. Constituyen las formas infectivas de los mamíferos. 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 aparente. El cinetoplasto se observa como un cuerpo oscuro cerca del núcleo. Se multiplican intracelularmente por fisión binaria.

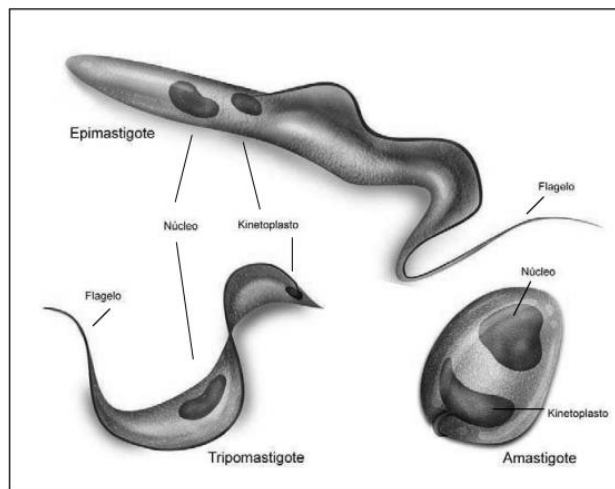


Figura 1.3. Estadios morfológicos de *T. cruzi* (Musikant, 2012).

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

El género *Trypanosoma* se caracteriza por tener un hospedero invertebrado y otro vertebrado para completar su ciclo de vida. Inicialmente un insecto triatómino hematófago, después de alimentarse de sangre del hospedero, defeca y junto con las heces y orina, deposita las fases infectivas del parásito, los tripomastigotes metacíclicos. Esta forma del parásito puede entrar 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 en amastigotes para replicarse por fisión binaria. Cuando la célula está llena de amastigotes, éstos se transforman en 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. 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 en epimastigotes al llegar al intestino medio que es donde se replican, 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).

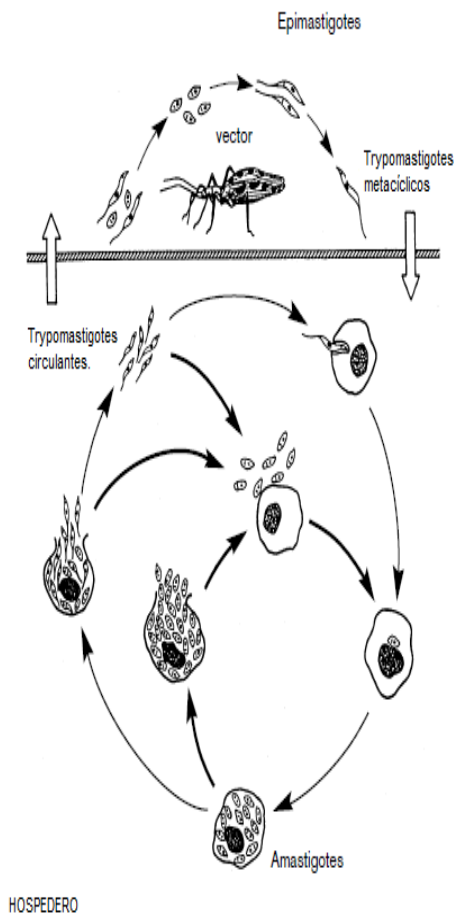


Figura 1.4. Ciclo de vida de *T. cruzi*. El vector defeca en la herida que ocasiona al alimentarse e infecta al hospedero mamífero. Una vez dentro del hospedero los tripomastigotes metacíclicos infectan las células, es ahí donde se diferencian en amastigotes para replicarse. Al lisis las células los 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 en epimastigotes, estos se transforman en tripomastigotes circulantes en la región terminal del intestino (Tyler y Engman, 2001).

1.5. 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: i) la transfusión con sangre contaminada (aunque en la actualidad se hacen pruebas de detección en bancos de sangre); ii) transmisión congénita de la madre infectada al feto; iii) trasplante de órganos de personas infectadas y iv) de manera oral por ingesta de alimentos y/o bebidas contaminadas con el parásito (Liu y Zhou, 2015).

1.6. Fases clínicas de la enfermedad

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

Fase aguda: en la mayoría de los individuos es asintomática; sin embargo, cuando hay síntomas éstos incluyen fiebres prolongadas, malestar generalizado, edemas subcutáneos y aumento en el tamaño del hígado, el bazo y nódulos linfáticos. En el caso particular de transmisión por vector, se muestran signos de entrada de *T. cruzi* a través de la piel (Chagoma de inoculación) 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. El otro 30 a 40% de las personas infectadas, llegan a presentar síntomas 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 presentan según la etapa de la infección.

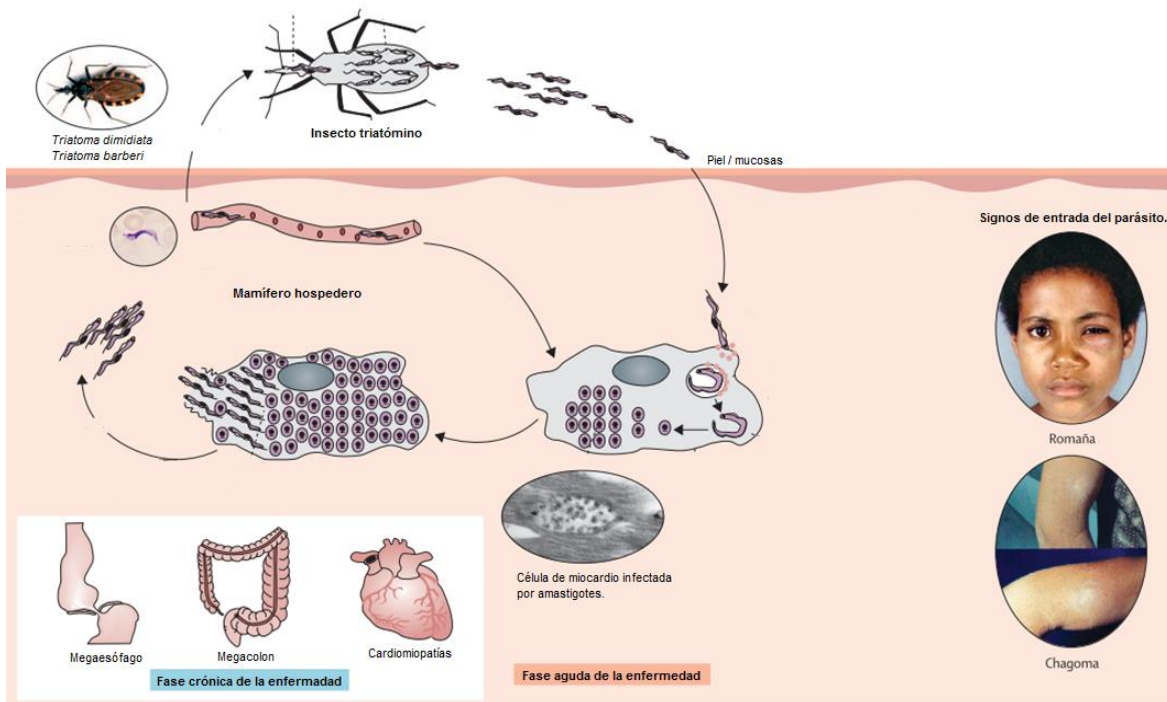


Figura 1.5. Panorama general de la enfermedad de Chagas. Ciclo de vida en la fase aguda de la enfermedad y los signos de entrada del parásito al hospedero. Complicaciones de distintos órganos en la fase crónica de la infección (Rassi, Rassi y Marin-Neto, 2010).

1.7. Diagnóstico

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-*T. 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. Así también, 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 inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI) ó hemaglutinación indirecta (HAI) (CENAPRECE SSA, 2015).

1.8. Tratamiento

Los fármacos que se utilizan actualmente en la clínica para el tratamiento de la enfermedad son i) el Benznidazol (N-bencill-2-nitroimidazol-1-acetamida; Bnz) un derivado del nitroimidazol y ii) 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 peso/día durante 60 días para el Bnz y de 8 a 10 mg/kg peso/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).

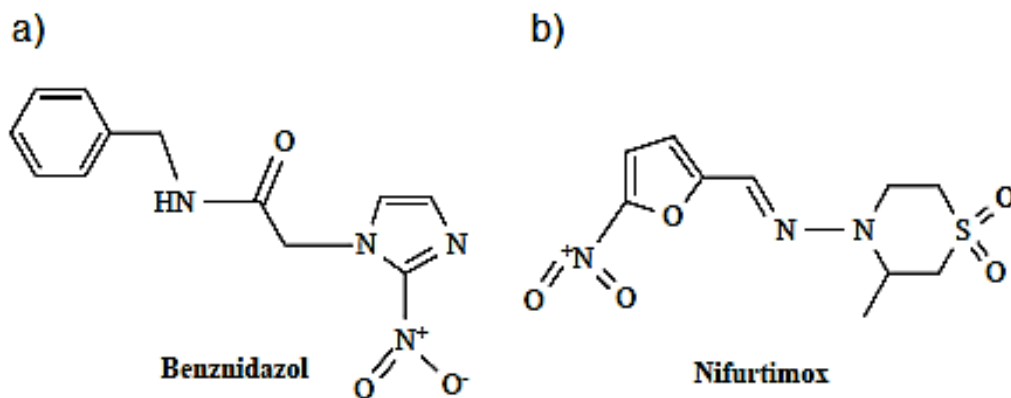


Figura 1.6. Estructura química de los fármacos utilizados en el tratamiento contra la infección por *T. cruzi*.

Los medicamentos sólo son eficientes en la fase aguda de la enfermedad, con un 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).

1.8.1. Modo de acción del Benznidazol y del Nifurtimox

Se propone que el modo de acción de ambos 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; Moreno et al., 1982 y Docampo et al., 1981) (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 nitroreductasas tipo I para que pueda actuar en el parásito (Hall y Wilkinson, 2011); los metabolitos reducidos del Bnz son los que están involucrados en la formación de uniones covalentes (aductos) 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) sino de inducir la degradación de ADN y proteínas (Goijman y Stoppani, 1985).

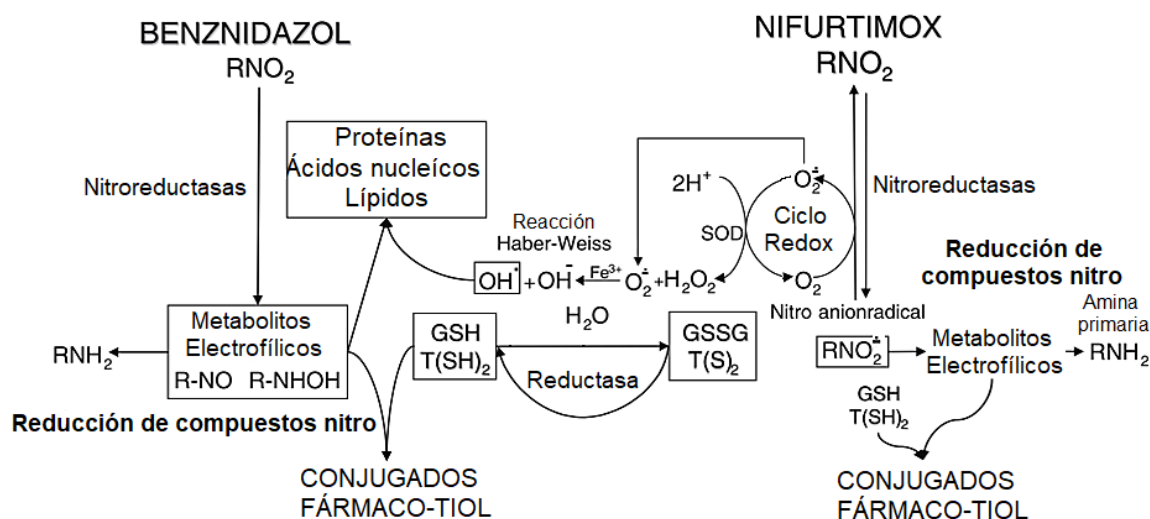


Figura 1.7. Función del tripanotión (T(SH)₂) y el glutatión (GSH) en el mecanismo de acción del Bnz y el Nfx. El grupo nitro de ambos fármacos se reduce a radicales libres o metabolitos electrofílicos por la acción de enzimas nitroreductasas. El T(SH)₂ y el GSH neutralizan los metabolitos derivados de 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 nitró (R-NO₂^{•-}) (Maya et al., 2007). Este radical desencadena un ciclo redox con oxígeno molecular al reducir parcialmente al O₂, regenerando el pro-fármaco produciendo anión superóxido (O₂^{•-}). Las enzimas superóxido dismutasa (SOD) catalizan la dismutación del O₂^{•-} en O₂ y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El O₂^{•-} y el H₂O₂ generan ion hidroxilo (OH⁻) y radical hidroxilo (•OH) en presencia de Fe³⁺. Finalmente es el •OH 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) lo que podría llevar a un aumento en la degradación de proteínas y estrés oxidante (Goijman y Stoppani, 1985).

Sin embargo, existen diversos estudios que refutan los mecanismos de acción antes descritos. Por ejemplo, Boiani et al. en el 2010 reportaron que epimastigotes de la cepa Tulahuen expuestos a 25 μM de Nfx por 4 h no presentan producción de H_2O_2 ni consumo de O_2 insensible a cianuro y sólo observaron una disminución de tioles reducidos del 20%. Con dichos resultados, los autores descartan la producción de EROs por el Nfx.

1.9. Metabolismo antioxidante en *T. cruzi*

En el metabolismo antioxidante de los tripanosomátidos, todo el sistema enzimático de desintoxicación de xenobióticos y peróxidos del parásito depende del tripanotión ($\text{T}(\text{SH})_2$) (Olin-Sandoval, Moreno-Sánchez y Saavedra, 2010) en lugar del glutatión (GSH), como ocurre en las células de mamífero.

El $\text{T}(\text{SH})_2$ es un conjugado de dos moléculas de GSH unidas por una molécula de espermidina (Spd) (Fig1.8).

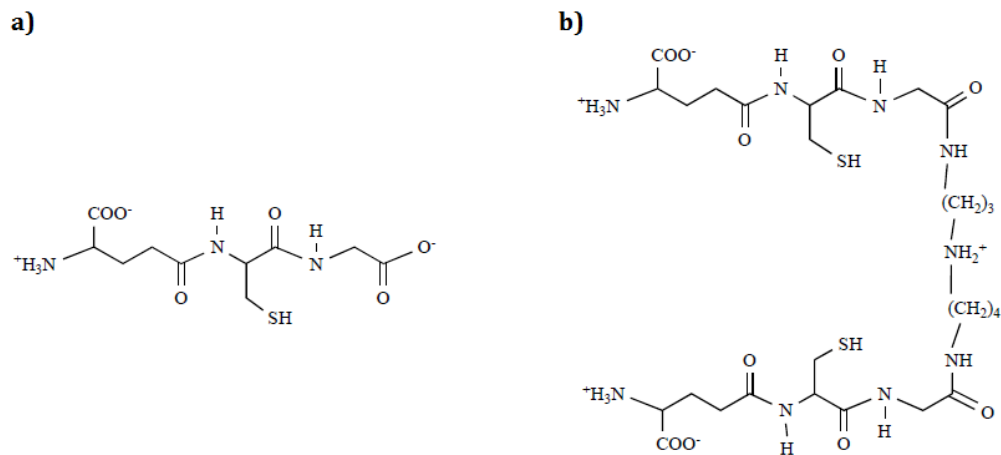


Figura 1.8. Principales tioles del metabolismo antioxidante de *T. cruzi*. **a)** GSH y **b)** $\text{T}(\text{SH})_2$ constituido por dos moléculas de GSH unidas por una molécula de Spd (Olin-Sandoval, Moreno-Sánchez, Saavedra, 2010).

La síntesis de $\text{T}(\text{SH})_2$ se alimenta de dos vías principales de suministro que son: la síntesis y el transporte de GSH y la síntesis y el transporte de poliaminas (Fig. 1.9) (Olin-Sandoval, Moreno-Sánchez, Saavedra, 2010). Para sintetizar el GSH,

inicialmente la enzima gama-glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS) cataliza la síntesis de γ -glutamilcisteína (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. Asimismo, datos de nuestro laboratorio indican que epimastigotes de *T. cruzi* pueden incorporar GSH del medio extracelular para sintetizar el T(SH)₂ (Vázquez et al., 2017).

Generalmente, la Spd se sintetiza *de novo* a partir de putrescina (Put) y S-adenosil metionina descarboxilada (dAdoMet) por la acción de la enzima espermidina sintasa (SpdS), a su vez, la dAdoMet se sintetiza por la enzima S-adenosil metionina descarboxilasa (AdoMetDC) al descarboxilar una molécula de S-adenosil metionina (AdoMet). Sin embargo, a diferencia de otros tripanosomátidos, *T. cruzi* no contiene ornitina descarboxilasa (ODC) por lo que no puede sintetizar Put a partir de ornitina. De igual forma, el parásito puede transportar poliaminas como Put y Spd del medio extracelular (Carrillo, 1999; 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 (Fig. 1.9. a).

Rio abajo en la vía antioxidante, el T(SH)₂ dona sus electrones al sistema enzimático de desintoxicación de peróxidos, convirtiéndose así en disulfuro de tripanotión (TS₂). El T(SH)₂ cede sus equivalentes reductores a la triparedoxina (TXN) y esta, a su vez, a la tryparedoxina peroxidasa (TXNPx). La TXNPx es responsable de la reducción de los hidroperóxidos que se generan durante el metabolismo basal del parásito, cuando éste se expone a fármacos o a las especies reactivas de oxígeno que el hospedero sintetiza para contender contra la infección por el parásito. Aunque *T. cruzi* tiene otras peroxidases, el par redox TXN-TXNPx es el mecanismo principal para contender contra el estrés oxidante (González-Chavez et al., 2015). Por último, el TS₂ 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) o se expulsa a través de transportadores LABCG2 hacia el medio extracelular (Perea et al., 2018). El tripanotión también puede formar aductos o uniones covalentes con metabolitos electrofílicos o proteínas para degradación o expulsión (Ulrich et al., 2017 y Perea et al., 2016).

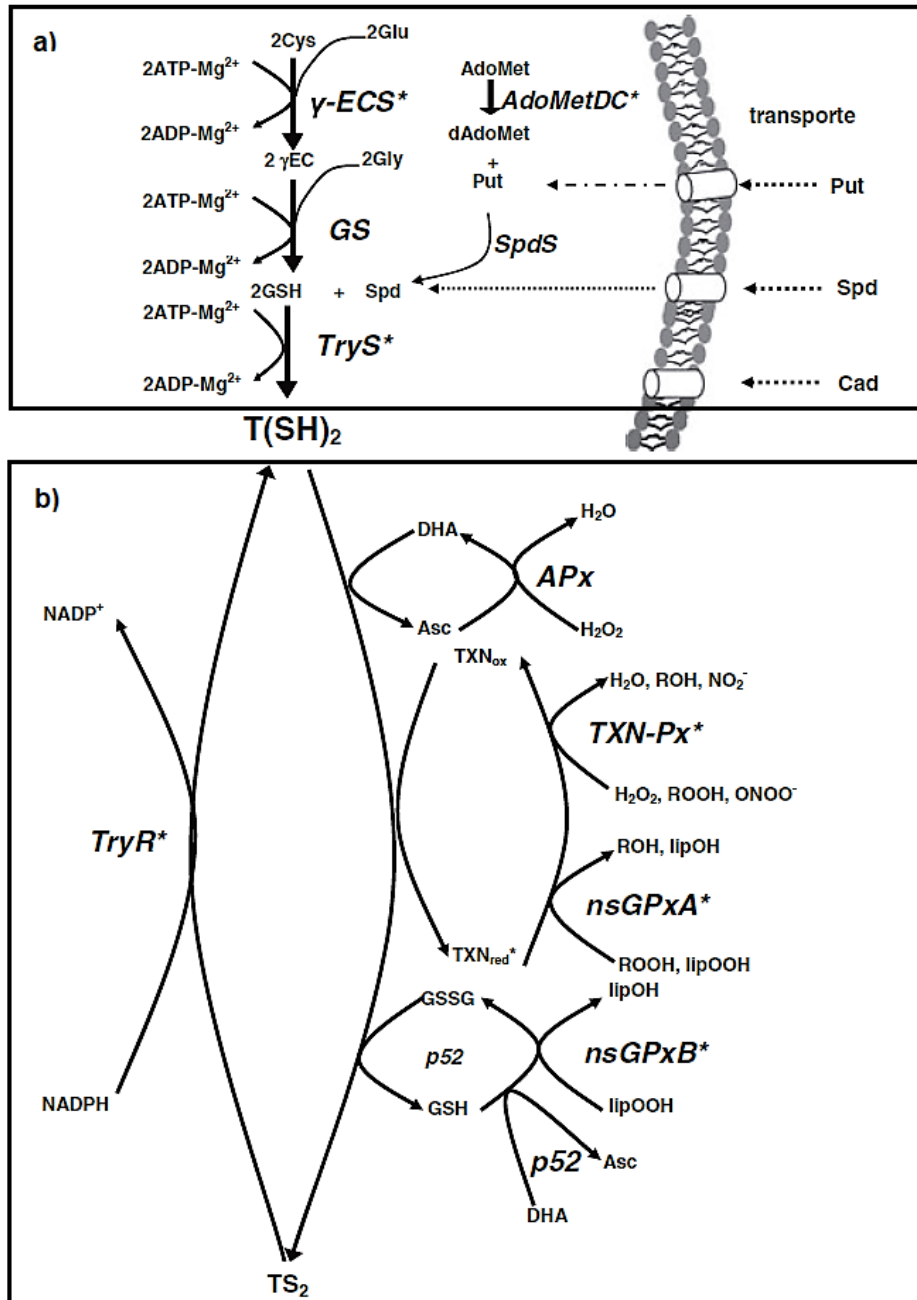


Figura 1.9. Metabolismo antioxidante de *T. cruzi*. a) Vía de síntesis de $T(SH)_2$ y b) vías de consumo y regeneración del tripanotión (Olin-Sandoval, Moreno-Sánchez y Saavedra, 2010).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PROYECTO

Desde que el Bnz y el Nfx se propusieron como medicamentos para tratar la infección por *T. cruzi*, múltiples grupos de trabajo han tratado de discernir el mecanismo de acción y los efectos de ambos fármacos. Sin embargo, con el paso del tiempo, se ha generado más controversia que consenso, debido a que las principales propuestas de modo de acción se contradicen entre grupos de investigadores.

En 1981, Docampo et al. reportaron en amastigotes de la Cepa Y expuestos a 1 mM de Nfx, la producción de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 . De igual forma, en 1988, Moreno reportó que el Nfx produce R-NO₂, aumenta la respiración insensible a cianuro y la producción de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 en *C. fasciculata*. Mientras que, en el 2010, Boiani et al. reportaron que epimastigotes de la cepa Tulahuen expuestos a 25 μ M de Nfx no produjeron EROs, especies reactivas de nitrógeno (ERNs) y no aumentó el consumo de oxígeno incluso en la concentración máxima del fármaco que se evaluó (200 μ M).

En el modo de acción del Bnz parece haber consenso con lo publicado en 1982 por Moreno et al., donde reportaron que en fracciones microsomales (1.2 mg/mL) de la cepa Tulahuen expuestas a 0.5, 1 y 2 mM de Bnz, no se estimula el consumo de oxígeno, ni la producción de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 .

Estudios en los que se han utilizado diferentes cepas y diferentes estadios (principalmente epimastigotes) de *T. cruzi*, han mostrado el efecto que tienen el Bnz y/o el Nfx 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 y Faundez et al., 2005).

En 1996, Repetto et al. observaron que en las cepas Tulahuen, LQ y DM28c el GSH, la glutationil espermidina (GHS-SP) y el T(SH)₂ disminuyeron entre 40 a 77% en parásitos incubados 2 h con 10 y 50 μ M de Nfx y Bnz,

respectivamente. Los autores atribuyen el efecto de las drogas a la conjugación con metabolitos electrofílicos, debido a que al reducir por métodos enzimáticos la concentración de tioles totales fue igual a la de los tioles reducidos.

En 1997, Maya y colaboradores mostraron que, con una dosis de 100 μM de Bnz durante 2 h, se disminuyó en un 80% las pozas de $\text{T}(\text{SH})_2$ en amastigotes, tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*. En el 2005, Faundez et al. reportaron que, en epimastigotes de la cepa MF disminuyeron 65 % la IC_{50} de Nfx y 55% la IC_{50} de Bnz al exponer a los epimastigotes simultáneamente con BSO, un potente inhibidor de la síntesis de GSH y de $\text{T}(\text{SH})_2$.

Los tres autores: Maya, Repetto y Faundez, concuerdan en proponer que, sea o no por el mismo mecanismo de acción, los fármacos llegan a una misma forma de daño al parásito a través de la disminución sustancial en las moléculas tiol de bajo peso molecular, principalmente el $\text{T}(\text{SH})_2$. Sus reportes señalan que el metabolismo antioxidante, parece ser el principal mecanismo de defensa de *T. cruzi* ante el estrés producido por el Bnz y por el Nfx, por lo que plantean que ambos fármacos matan o inhiben el crecimiento de los parásitos al incrementar el estrés oxidante en la célula.

En 2014, Trochine et al. evaluaron por espectrometría de masas las moléculas derivadas de la biotransformación del Bnz y su interacción con biomoléculas, al exponer epimastigotes DM28c a 50 μM del fármaco durante 6 horas. Los aductos del fármaco que se formaron en mayor proporción fueron con el $\text{T}(\text{SH})_2$, provocando una disminución del 30% en su concentración. Hasta el momento, no se tienen reportes de exposiciones a Bnz durante más de 6 h.

En 2010, Boiani et al. reportaron que en epimastigotes expuestos durante 4 h con 25 μM de Nfx, la poza de tioles disminuye un 20% (porcentaje bajo de disminución comparado con otros autores ya mencionados), y al analizar el efecto del fármaco en tratamientos prolongados de 5 días, no se observaron diferencias en las moléculas con grupos tiol con respecto al control. Esto nos sugiere que, en

tiempos prolongados de exposición al Nfx, las pozas de tioles podrían tener la capacidad de recuperarse. Mientras tanto, Andrade et al. (2008) indujeron resistencia a Bnz *in vitro*, al exponer parásitos a concentraciones crecientes de Bnz, e *in vivo*, después de 25 pases sucesivos en ratones tratados con dosis únicas de Bnz (100 mg/kg/día). Ellos reportaron la expresión ó la sobreexpresión de 64% de las proteínas identificadas en cepas resistentes, lo que nos indica que existen mecanismos de resistencia a Bnz a tiempos prolongados de exposición.

Sin embargo, no existe un estudio que analice de manera integral la respuesta del parásito a la exposición de los fármacos tomando en cuenta a todos los metabolitos precursores de la síntesis de T(SH)₂, las actividades enzimáticas de la vía metabólica antioxidante del parásito, en células en crecimiento, así como el efecto en el flujo metabólico de reducción de peróxidos. Por lo tanto, es necesario realizar estudios adicionales para entender los mecanismos de acción del Bnz y del Nfx 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

La enfermedad de Chagas se considera como una de las 13 enfermedades infecciosas olvidadas del mundo a pesar de la estimación de que hay 7 millones de personas infectadas con *T. cruzi* y otros 100 millones que viven en zonas de riesgo de contraer la infección (WHO, 2018).

Se dice que un adulto con enfermedad de Chagas fue un niño que no se diagnosticó ni se trató contra la infección por *T. cruzi* de una manera apropiada (Altcheh, 2015). Lamentablemente, debido a que no existen medicamentos eficaces, 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-Schettino, 2015).

Aunado a lo anterior, 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; 2) son muy tóxicos; producen efectos secundarios múltiples y severos, a tal grado que las personas optan por abandonar el tratamiento, 3) los fármacos ya no son comercializados por la industria farmacéutica y sólo los sintetizan con fines humanitarios, los cuales son distribuidos a través de la Organización Mundial de la Salud y 4) se ha demostrado en los laboratorios que los parásitos son capaces de desarrollar resistencia a los fármacos, lo cual podría pasar en poblaciones humanas, debido a que muchos pacientes abandonan el tratamiento.

De estos hechos parte la necesidad de buscar nuevos esquemas de tratamiento, nuevos fármacos o la búsqueda de blancos terapéuticos que sean más específicos y menos tóxicos, 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 y al Nfx con la idea de entender los mecanismos de defensa con los que cuenta el parásito. Profundizar en el modo de acción de estos fármacos nos puede ayudar a entender sus mecanismos citotóxicos y a replantear esquemas de tratamiento menos agresivos con estos fármacos contra la infección por *T. cruzi*.

4. HIPÓTESIS

La exposición de *Trypanosoma cruzi* durante 24 horas a Bnz ó Nfx inducirá cambios compensatorios a nivel de las actividades enzimáticas del metabolismo antioxidante con el fin de mantener la homeostasis redox de la célula.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar integralmente los efectos del Bnz y del Nfx en la dinámica del metabolismo antioxidante de *T. cruzi* para entender los mecanismos de defensa del parásito y resistencia a estos xenobióticos.

Objetivos particulares

- Determinar la dosis del Bnz y del Nfx que inhiben en un 50% el crecimiento del parásito (IC₅₀).
- Analizar la dinámica de cambios de los tioles y de las poliaminas en epimastigotes expuestos a concentraciones inhibitorias del crecimiento celular.
- Analizar los cambios en las actividades de las enzimas del metabolismo antioxidante: glutatión sintetasa (GS), tripanotión sintetasa (TryS), tripanotión reductasa (TryR), triparedoxina (Txn) y triparedoxina peroxidasa (TxnPx).
- Evaluar el efecto de los fármacos en el flujo metabólico de reducción de hidroperóxidos.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

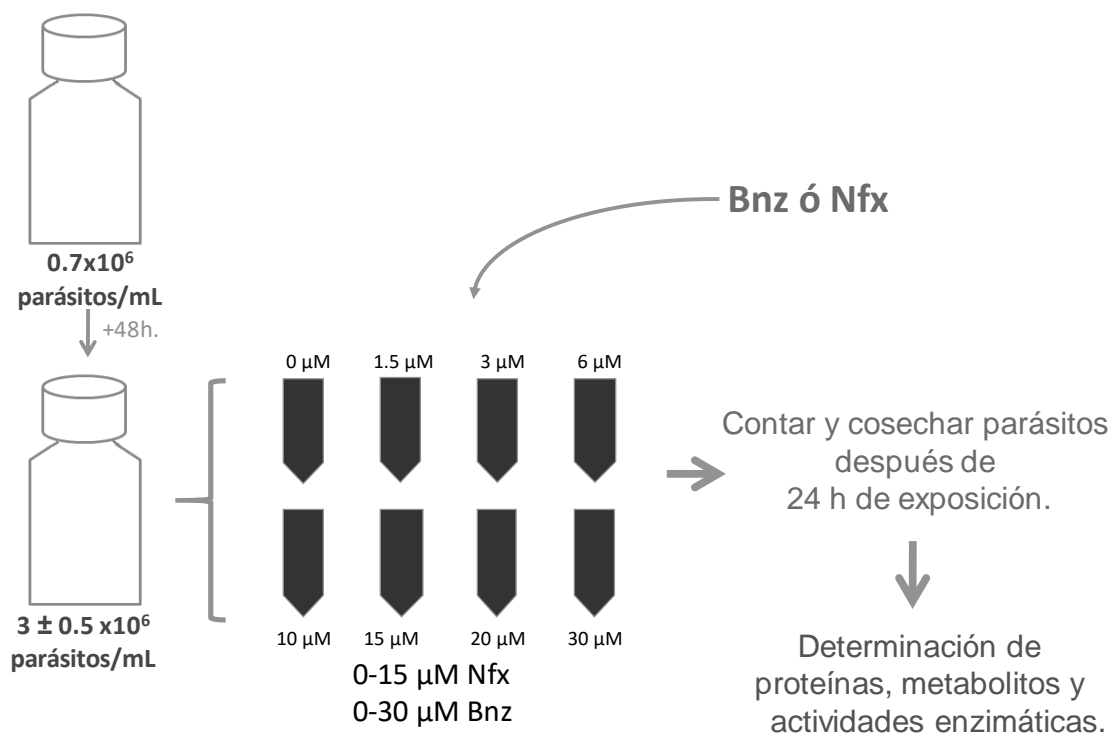


Figura 6.1 Estrategia experimental. El cultivo se inició con 0.7×10^6 parásitos/mL en un volumen total de 600 mL en frascos de 1 L a 28 °C. Al cabo de 48 h, el cultivo con una concentración de $3 \pm 0.3 \times 10^6$ parásitos /mL se distribuyó en tubos Falcon de 50 mL y se expusieron 25 mL de cultivo a diferentes concentraciones de Bnz durante 24 h. Transcurrido el 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, evaluar actividades enzimáticas y flujos metabólicos.

7. MÉTODOS

7.1 Condiciones de cultivo y características del crecimiento celular de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Querétaro

Epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Querétaro se cultivaron en medio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 25 µg/ml de hemina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina y se incubaron a una temperatura de 28°C.

La caracterización de la cinética del crecimiento poblacional de la cepa Querétaro se realizó con el siguiente protocolo: se hicieron curvas de crecimiento con $1 \pm 0.2 \times 10^6$ parásitos/mL y se contaron cada 24 h hasta llegar a la fase estacionaria del crecimiento. Se estableció que la duración de la fase exponencial de crecimiento de los epimastigotes tiene una duración de cinco días y un tiempo generacional de 20 horas. Con esta información, se pudo elaborar un diseño experimental de exposición a los fármacos durante la fase exponencial de crecimiento y nos permitió determinar el número de parásitos iniciales necesarios para alcanzar las concentraciones de $3 \pm 0.2 \times 10^6$ parásitos/mL con los que se iniciaron los experimentos de exposición.

Los cálculos de la constante de velocidad de crecimiento (k), el tiempo de generación (G) y el número de generaciones (n) se realizaron utilizando las formulas $k = \frac{2.303 (\log N - \log N_0)}{t - t_0}$, $G = \log_{10} 2 / k$ y $n = t / G$, respectivamente. Donde N_0 =número de parásitos al tiempo cero, N =número de parásitos en un tiempo t , t_0 = tiempo inicial, t =tiempo en crecimiento exponencial.

Tabla 1. Crecimiento poblacional	
k	0.7 ± 0.1 días ⁻¹
n	6.2 generaciones
G	20 ± 1.8 horas

Tabla 1. Crecimiento poblacional (Silva-Carmona, 2016)

7.2. Exposición a los fármacos

Para evaluar el efecto de los fármacos en el crecimiento del parásito, la concentración de tioles y poliaminas, las actividades enzimáticas del metabolismo antioxidante y en el flujo metabólico, se evaluaron concentraciones de ATP en parásitos expuestos al Bnz para definir el rango de concentraciones que se utilizarían y así asegurar trabajar sólo en dosis inhibitorias de crecimiento y con viabilidades de más del 80%, una condición necesaria para los análisis metabólicos.

El protocolo experimental de exposición a los fármacos consistió en inocular 200 mL de medio LIT suplementado con SFB para las exposiciones a Bnz y 150 mL de medio para las exposiciones a Nfx a una concentración inicial de 0.7×10^6 parásitos/mL y se incubaron a 28°C. Las células del cultivo se contaron cada 24 horas hasta el final del experimento (4 días). A las 48 h de haber iniciado el cultivo (densidades celulares de $3 \pm 0.2 \times 10^6$ parásitos/mL), los epimastigotes se expusieron durante 24 h a concentraciones de 1.5 - 30 μ M de Bnz o de 1.5 a 15 μ M de Nfx disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO). En todos los casos, se utilizó un cultivo control al que se le añadió el volumen máximo de DMSO utilizado para adicionar el fármaco. Transcurridas 24 h de exposición a los fármacos, se evaluó el crecimiento celular contando en cámaras de Neubauer el número de parásitos móviles, los cuales se cosecharon y se procesaron para las respectivas determinaciones.

Para determinar las concentraciones a las cuales se inhibe el crecimiento en un 50 % (IC_{50}), se calculó el crecimiento relativo de los parásitos, el cual es la resta de la concentración de parásitos crecidos en las distintas concentraciones de Bnz ó Nfx después de 24 h de agregado el fármaco, menos la concentración de parásitos del día de inicio de la exposición. Esta diferencia se normalizó en porcentaje tomando el 100% como la concentración relativa de parásitos obtenida del cultivo sin fármaco. Sólo se tomaron en cuenta los cultivos en los que la concentración de parásitos fue mayor o igual al del día de exposición (esto es, que no hubiera muerte celular) y en los que se observara al menos 80% de viabilidad

de los parásitos. El análisis de los datos se hizo mediante un ajuste de dosis-respuesta en el programa Origin8.

7.3. Determinación de metabolitos intermediarios del sistema antioxidante

Después de las 24 h de exposición a Bnz ó Nfx, los epimastigotes se cosecharon por centrifugación a 4500 x g por 10 min y se lavaron con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM). Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C hasta el día de la determinación de los metabolitos. En el caso de las actividades enzimáticas y el flujo metabólico, las determinaciones se realizaron el mismo día de cosecha.

La determinación de los metabolitos intermediarios del sistema antioxidante de *T. cruzi* (tioles y poliaminas) se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), haciendo algunas modificaciones a las metodologías previamente estandarizadas en nuestro laboratorio (Olin-Sandoval et al., 2012).

Para la determinación de los tioles totales, las pastillas de parásitos se resuspendieron en 90 µL de amortiguador de lisis (HEPES 20 mM, EDTA 1 mM, KCl 0.15 mM pH 7.4) con DTT 20 mM. Las células se rompieron con tres ciclos de congelación en N₂ y descongelación a 37 °C. El lisado celular se centrifugó a 20 817 x g durante 10 min, el sobrenadante se recuperó y los tioles se redujeron con un exceso de borohidruro (3-5 mg) de sodio mediante una incubación en hielo durante 10 min, esto quiere decir que en esta tesis sólo se reportan concentraciones de tioles totales.

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 20 817 x g por 3 min, el sobrenadante se filtró a través de una membrana con poro de 0.45 µm y 20 µL de la muestra filtrada se analizaron por HPLC. La separación de tioles se realizó por cromatografía en fase reversa en una columna Altima HP C18 3 µm 150 x 2.1

mm; la fase móvil que se utilizó fue una mezcla de acetonitrilo y ácido trifluoroacético (TFA) al 99:1. Los tioles se derivatizaron con DTNB y se detectó la absorbancia a 412 nm.

Para la determinación de las poliaminas, los parásitos se lisaron al resuspender la pastilla celular en 50 µL de amortiguador de lisis con DTT 1 mM adicionado con 3% de PCA; el lisado celular se centrifugó 10 min a 20 817 x g. El extracto citosólico se neutralizó con bicarbonato de sodio en polvo y se evaporó a 70°C a sequedad. 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.

Para la separación 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 una columna Waters Spherisorb 5 µm 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.

7.4 Determinación de las actividades de las enzimas del metabolismo antioxidante

Para la determinación de las actividades enzimáticas y flujos metabólicos, las pastillas de parásitos se resuspendieron en 80 µL de amortiguador de lisis adicionado con DTT 0.1 mM e inhibidor de proteasas PMSF 1 mM. Las células se rompieron con tres ciclos de congelación en N₂ y descongelación a 37 °C. El lisado celular se centrifugó a 20 817 x g durante 10 min y el sobrenadante (fracción citosólica enriquecida) se recuperó.

Las actividades enzimáticas se determinaron a 37°C en condiciones de velocidad inicial, esto es: 1) con concentraciones saturantes de sustratos específicos de la reacción; 2) tomando en cuenta los primeros minutos de la zona lineal de la reacción, esto es, sin formación evidente de productos. En este caso, las enzimas que pueden consumir el producto de la reacción de interés que están presentes en el extracto no contribuyen significativamente a la disminución de la concentración del producto, ya que las enzimas acoplantes del ensayo están en exceso y son las que principalmente transforman el producto de la reacción de la enzima medida; y 3) comprobando que los ensayos se realizaran en la parte lineal de acuerdo con el contenido de proteína.

Para asegurar la especificidad de la actividad a evaluar en el extracto, se usaron reacciones paralelas con toda la mezcla de reacción, pero en ausencia de cada uno de los sustratos específicos; esta velocidad de reacción inespecífica (si es que la hubiera), se restó al valor de velocidad obtenida en el ensayo enzimático completo. Cabe mencionar que, realizando muchos controles, se pueden determinar de manera muy eficiente la actividad de una enzima en muestras complejas como son los extractos celulares. Este valor es el que nos dará el contenido de enzima ACTIVA en la célula, la cual puede variar si las células se exponen a fármacos.

Las actividades de las enzimas glutatión sintetasa (GS) y tripanotión sintetasa (TryS) se determinaron monitoreando la producción de ADP (Fig. 7.1) con un ensayo acoplado a las enzimas piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa. La mezcla de reacción contenía amortiguador de ensayo Hepes 100 mM pH 7.4, EDTA 0.5 mM, MgSO₄ 10 mM, KCl 100 mM, NADH 0.2 mM, DTT 5 mM, PEP 2 mM, ATP 1 mM y los sustratos específicos. Para la GS, de gama-glutamilcisteína (γ EC) 0.4 mM y de glicina (Gly) 8 mM con la que se inició la reacción (Fig.7.1-a). Para la TryS, Spd 10 mM y la reacción se inició con GSH 1 mM (Fig.7.1-b). Los ensayos se monitorearon mediante un espectrofotómetro a 340 nm por la desaparición del NADH.

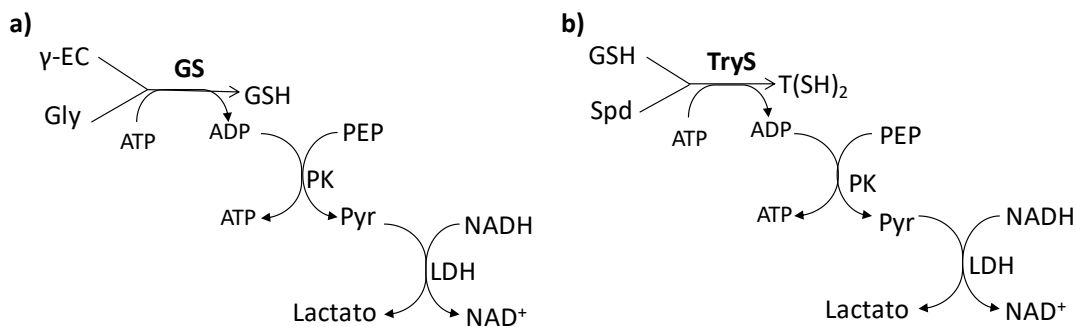


Figura 7.1. Esquemas de los sistemas acoplantes que se utilizaron para monitorear las actividades de las enzimas a) GS y b) TryS.

La actividad de la tripanotión reductasa (TryR) se determinó a 37°C por el consumo de NADPH al reducir el disulfuro de tripanotión (TS_2) a T(SH)_2 , lo cual se monitoreó espectrofotométricamente a 340 nm. La mezcla de reacción contenía amortiguador Hepes 40 mM pH 7.4, EDTA 1 mM, NADPH 0.24 mM y TS_2 0.25 mM. La reacción se inició con el extracto celular (Fig. 7.2).

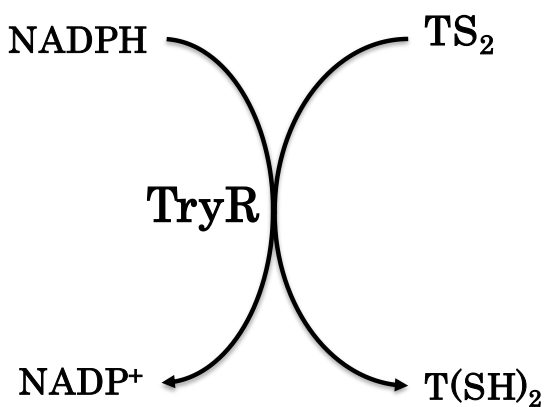


Figura 7.2. Reacción de la enzima TryR se monitoreó espectrofotométricamente por el consumo del NADPH por parte de la enzima presente en el extracto celular.

La actividad de la TXNPx se determinó como se reportó por el grupo de trabajo (González-Chávez et al., 2015) (Fig. 7.3), mediante la reconstitución *in vitro* de la vía antioxidante de desintoxicación de peróxidos con la TryR, TXN en presencia del metabolito reductor específico T(SH)₂. Brevemente, la reacción contenía amortiguador Hepes 40 mM (EDTA 1 mM pH 7.4), hidroperóxido de cumeno (cumOOH) 0.1 mM, T(SH)₂ 0.45 mM y se monitoreó espectrofotométricamente la oxidación del NADPH a 340 nm, iniciando la reacción con el extracto celular debido a que se tienen que restar la reacción espuria que existe entre el T(SH)₂ y el cumOOH. La especificidad del ensayo se determinó en una reacción en ausencia de TXN.

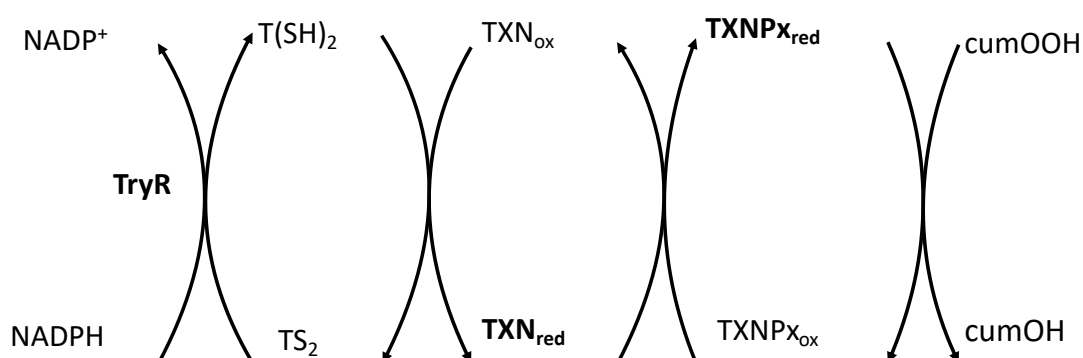


Figura 7.3. Reacciones del sistema acoplante que se utilizó para medir las actividades enzimáticas de la TXN y de la peroxidasa.

Cabe mencionar que, en esta tesis, la reacción de oxido-reducción de la proteína TXN se analizó de manera enzimática (con constantes de afinidad para sus dos sustratos T(SH)₂ y TXNPx) más que con los datos de su potencial redox, ya que dependiendo del enfoque del estudio se puede analizar de las dos maneras (Pillay et al., 2011; González-Chávez et al., 2015, González-Chávez et al., 2019). Estos valores de actividad de TXN son útiles para comparar los cambios en las actividades (contenidos de enzima o proteína ACTIVA) de todas las enzimas del sistema antioxidante.

7.5. Evaluación del flujo metabólico de reducción de peróxidos

La determinación del flujo metabólico de reducción de peróxidos (Fig. 1.9-b) consistió en una evaluación *ex vivo* en extractos celulares de parásitos expuestos a distintas concentraciones inhibitorias del crecimiento celular de fármacos, con sus respectivos controles (sin fármacos), mediante el monitoreo de la reducción del NADPH y el cumOOH en las mismas condiciones de amortiguador de reacción, pH y temperatura que se utilizaron para medir la V_m de las enzimas del metabolismo antioxidante.

Para asegurar la homogeneidad en los ensayos, se hicieron mezclas de reacción que contenían NADPH 0.16 mM, T(SH)₂ 0.45 mM y extracto celular, se determinó la reducción del TS₂ por la acción de la TryR del extracto. Se añadió NADPH nuevamente y se esperó a que la reducción del TS₂ fuera completa (sin cambio en la absorbancia). Posteriormente, se inició la reacción con cumOOH 0.1 mM. La actividad que se observa una vez iniciada la reacción es la suma del flujo de reducción del cumOOH más la interacción del cumOOH con el T(SH)₂, por ello en cada ensayo se realizó el siguiente control: NADPH, T(SH)₂, TryR recombinante (esperar basal de reducción del TS₂) y cumOOH, la reacción no enzimática entre el cumOOH y el T(SH)₂ se restó en cada determinación de actividades de extractos celulares. En ausencia del T(SH)₂ no hay oxidación inespecífica de NADPH.

7.6. Purificación de enzimas recombinantes para los ensayos enzimáticos

La clonación y sobreexpresión de los genes codificantes para las enzimas que se utilizaron para los sistemas acoplantes en las determinaciones de actividades enzimáticas se realizaron previamente en el laboratorio (Olin-Sandoval et al., 2012). Para la purificación de las enzimas recombinantes se cultivaron células *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido pET28 conteniendo un promotor T7 *lac* y el gen que codifica para las enzimas recombinantes, etiquetado con cola de

histidinas. Se indujo la sobreexpresión de las enzimas por método de autoinducción; brevemente, se realizó un precultivo con un inóculo de colonias transformantes suplementadas con 100 µg de kanamicina/mL y se incubó a 37 °C en agitación durante 16-18 h. Se inocularon 2.5 mL de dicho precultivo en matraces de Erlenmeyer por cada 250 mL de cultivo de autoinducción (tryptona 1%, extracto de levadura 0.5%, glicerol 0.5 %, glucosa 0.05 %, α-lactosa 0.2 %, NaH₂PO₄ 12.5 mM, KH₂PO₄ 12.5 mM, NH₄Cl 25 mM, Na₂SO₄ 2.5 mM y MgSO₄ 2 mM) suplementado con kanamicina y se incubó a 37 °C en agitación; 4 h después, la sobreexpresión se favoreció al cambiar la temperatura de incubación a 25 °C en agitación, durante 16-18 h.

Las células se cosecharon a 4 500 x g y se resuspendieron en 10 mL de amortiguador de lisis para *E. coli* (trietanolamina 100 mM, pH 7.4, NaCl 300 mM e imidazol 2 mM) y se lisaron por sonicación. Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad a metales con resina de intercambio iónico acoplada a cobalto (TALON metal-affinity resin; Clontech). Después de sonicar, el lisado celular se centrifugó a 20 817 x g y el sobrenadante clarificado se incubó con la resina por 45 min en agitación a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados con 10 mL de amortiguador de lisis, posteriormente un lavado con amortiguador de lisis con imidazol 10 mM y finalmente las enzimas se eluyeron con amortiguador de lisis con 100 mM de imidazol. Las enzimas se concentraron en un amicón con filtro (Milipore) centrifugando media hora a 4 500 x g. Las enzimas se guardaron a -20 °C en dilución 1:2 con glicerol estéril. La estabilidad de las enzimas se preservó hasta un máximo de tres semanas después de su purificación.

7.7. Cuantificación de proteína

El procesamiento de las muestras de proteína correspondientes a los metabolitos consistió en tomar 1 mL de los distintos cultivos de parásitos expuestos por 24 h a Bnz ó Nfx; se lavaron con PBS, se centrifugaron a 4 500 xg durante 10 min y se

resuspendieron en 100 μ L de solución A de Lowry (NaCO_3 2%, NaOH 0.4%, tartrato de Na-K 0.16% y SDS 1%). En las actividades enzimáticas y flujos metabólicos se hicieron diluciones 1:10 de las fracciones citosólicas enriquecidas que se utilizaron en los ensayos.

El contenido proteico se cuantificó por el método de Lowry (Lowry et al, 1951). Se adicionó 1 mL de una mezcla 49:1 de solución A y B (CuSO_4 4%), se agitó e incubó 10 min a T.A. Posteriormente, se añadieron 100 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu diluido 1:2 con H_2O y se incubó 20 min a T.A. Se determinó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 660 nm.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Validación del criterio de viabilidad celular de *T. cruzi*

En los estudios con *T. cruzi*, se utiliza la movilidad del parásito como un criterio de viabilidad, ya que no se cuenta con colorantes vitales efectivos que permitan diferenciar entre parásitos vivos y muertos.

En la figura 8.1 se muestran los resultados tras 24 h de exposición a Bnz. Se contaron en el microscopio en cámara de Neubauer los parásitos móviles, los parásitos totales (los móviles más los no móviles) y la concentración de proteína correspondiente a cada cultivo. Se observa que a partir de 35 μM de Bnz, la concentración de proteína se mantiene constante y es en dicha concentración donde se empiezan a observar parásitos no móviles con cambios en la morfología.

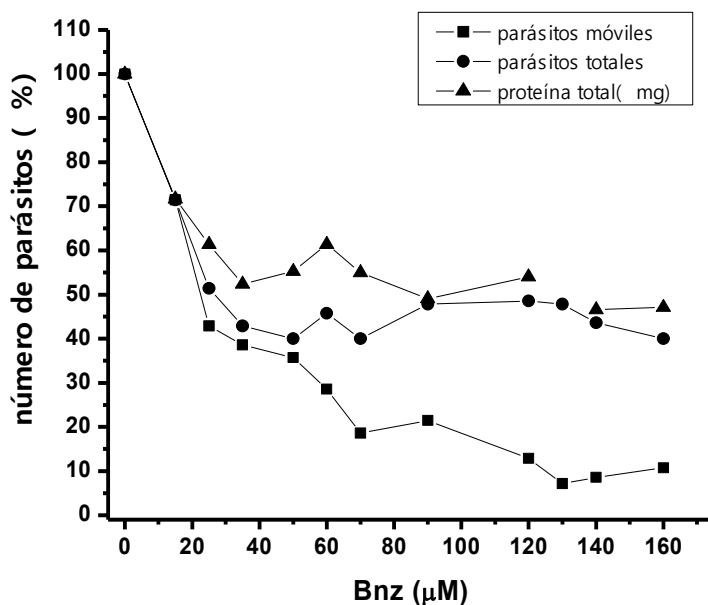


Figura 8.1. Correlación de: parásitos móviles en cuadros, parásitos totales (móviles + no móviles) en círculos y contenido de proteína en triángulos con respecto a distintas concentraciones de Bnz. n=2.

La viabilidad se evalúa como un indicador del estado metabólico de la célula mientras que la cantidad total de proteína celular se puede usar como un estimado de la biomasa celular. Aunque se puede determinar una relación entre proteína total y número de parásitos, el contenido de proteína no puede considerarse un parámetro de viabilidad, ya que los parásitos muertos y sin lisar contribuyen a la proteína total de la muestra.

Debido a que, el ATP es la molécula energética más importante para las células, sus niveles de concentración deben ser estables y esto sólo es posible en células metabólicamente activas (Nelson y Cox, 2015). Para comprobar si los parásitos no móviles seguían siendo metabólicamente activos, se determinó el contenido de ATP en parásitos expuestos a 0, 20, 40 y 100 μM de Bnz. En la figura 8.2 se observa que en 20 μM de Bnz, concentración en la cual hay 100% de movilidad en los parásitos, el ATP presentó una disminución de 30-40 %, mientras que con 40 y 100 μM de Bnz el ATP disminuyó en un 70% lo que nos sugiere que, en estas últimas concentraciones, la viabilidad está muy comprometida.

Estos resultados concuerdan con otros hallazgos del grupo de trabajo con el parásito *Entamoeba histolytica* en el que se analizó la dependencia de la viabilidad celular con el contenido de ATP. Se determinó que una disminución mayor del 50% en el contenido del ATP compromete la viabilidad celular (Pineda et al., 2015). Este mismo comportamiento se ha observado en células tumorales (resultados sin publicar).

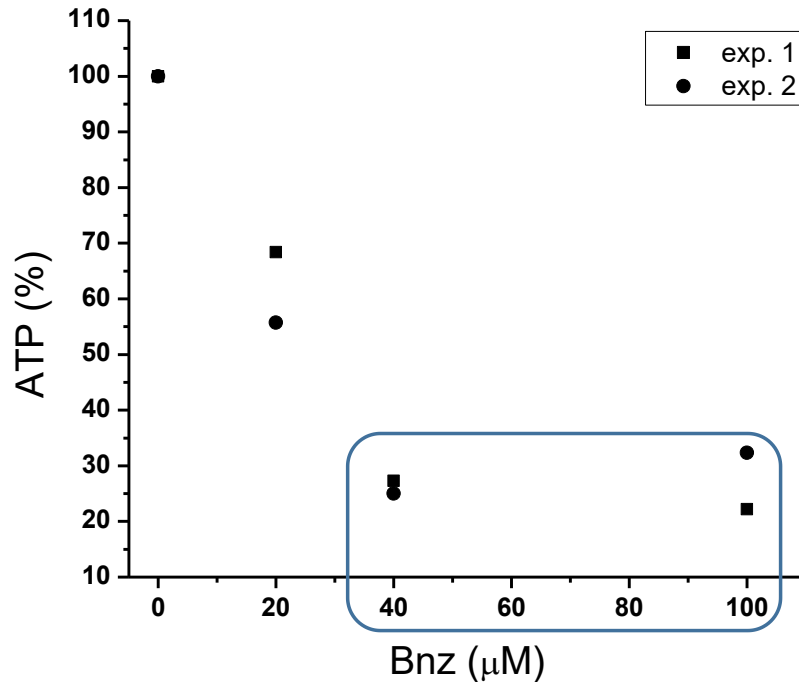


Figura 8.2. Contenido de ATP en células expuestas 24 h a Bnz (20-100 μM) en dos experimentos de cultivos celulares independientes. 100%=6.7 \pm 1.5 nmoles/mg de proteína.

Con base a los resultados anteriores, se decidió trabajar con concentraciones de fármaco que sólo afectaran el crecimiento celular de los parásitos sin que tengan efectos importantes en la viabilidad, ya que esto es vital para determinar cambios en el metabolismo antioxidante de únicamente las células metabólicamente activas. Debido a que en concentraciones letales de los fármacos los resultados metabólicos no son confiables, el metabolismo normalmente se evaluó en cultivos celulares con viabilidad mayor al 85%. Se usó el criterio de movilidad como parámetro de viabilidad.

8.2 Efecto de los fármacos en el crecimiento de los parásitos

En la figura 8.3 se muestra el efecto citostático del Bnz y del Nfx después de 24 h de exposición a los compuestos. Se evaluó el crecimiento relativo donde el 100% es el valor de la resta de la concentración de parásitos después de 24 h de exposición menos la concentración de parásitos del día 0 de exposición.

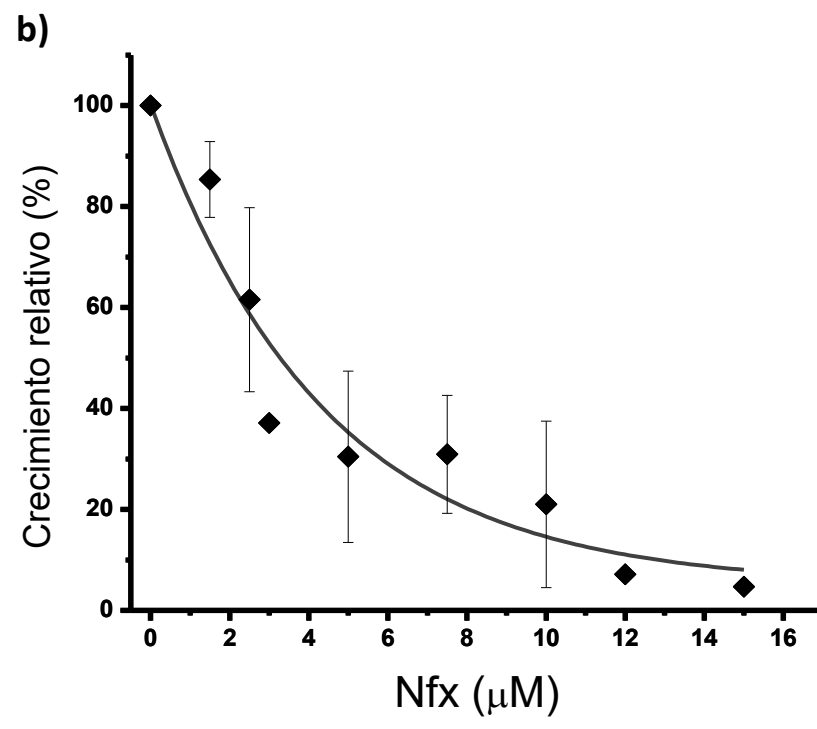
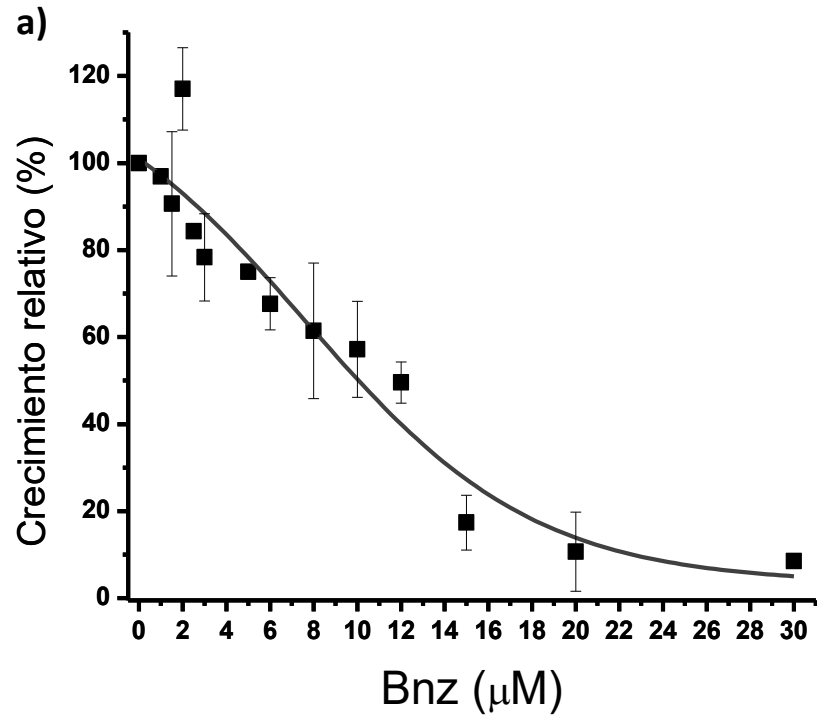


Figura 8.3. Crecimiento relativo de parásitos expuestos 24 h a Bnz ó Nfx a 28 °C en medio LIT. a) cultivo celular expuesto a Bnz, n=10 cultivos celulares independientes y b) cultivo celular expuesto a Nfx, n=8 cultivos celulares independientes.

En el ajuste de los datos experimentales se observa cómo responde la población de parásitos al estrés provocado por los fármacos. Para el Nfx, el patrón de decaimiento es abrupto, al mostrar una disminución en el crecimiento de por lo menos el 10% desde la primera concentración que se utilizó. En contraste, para el Bnz se observa una ventana de ligera resistencia en las primeras concentraciones del fármaco, por lo que tiene un valor de IC₅₀ mayor.

En la Tabla 2, se muestran las concentraciones necesarias para disminuir el crecimiento celular en un 50% (IC₅₀). La IC₅₀ para el Bnz fue 3.6 veces mayor con respecto al Nfx, lo que indica que este último es más potente que el Bnz. Este efecto tóxico mayor para el Nfx puede deberse a que presuntamente tiene un efecto doble en su mecanismo de acción: además de generar metabolitos electrofílicos, también provoca estrés oxidante a través de la producción de EROs (Maya, 2007). Esto correlaciona bastante bien con el hecho que en la clínica se suministran dosis menores de Nfx para los pacientes bajo tratamiento (CENAPRECE SSA, 2015). No se observaron efectos en el crecimiento celular ocasionados por el volumen máximo utilizado del vehículo.

Tabla 2. Concentración de los fármacos que inhiben el crecimiento celular en un 50% (IC₅₀).

IC₅₀ a fármacos	
Bnz	11.4 ± 3 μM (10)
Nfx	3 ± 0.8 μM (8)

Tabla 2. Concentración de los fármacos que inhiben el crecimiento celular en un 50% (IC₅₀). Entre paréntesis se indica el número de cultivos de parásitos independientes que se determinaron.

8.3 Perfil de tioles en parásitos expuestos a los fármacos

La dinámica de los tioles libres Cys, GSH y T(SH)₂ en los parásitos expuestos a los fármacos se muestra en la Fig. 8.4. En los parásitos expuestos a Bnz se observó un aumento en la poza de Cys hasta 10 μM de Bnz y por arriba de esta concentración se reestablecieron los valores normales con respecto al contenido de Cys del control. La poza de GSH aumentó en todas las concentraciones de Bnz que se evaluaron, aunque sólo hubo diferencias estadísticamente significativas a concentraciones de 1.5 y 3 μM de Bnz. En el caso de los parásitos expuestos 24 h a Nfx, la Cys y el GSH mostraron patrones de cambio muy similares observándose una tendencia al alza, a excepción de la concentración más alta del Nfx en donde se observó que disminuyeron ligeramente respecto a la condición sin el fármaco.

En cuanto al T(SH)₂, este mostró un patrón de comportamiento dual con respecto a la condición más parecida a la IC₅₀ de Bnz (11 μM), mostró una tendencia a disminuir en las concentraciones de 1.5 y 3 μM de Bnz a pesar de tener el GSH precursor en exceso, mientras que se incrementó significativamente en 10, 15 y 20 μM de Bnz para después disminuir y reestablecerse a los niveles del control. Con respecto al contenido de T(SH)₂ en los parásitos expuestos a Nfx, sus pozas disminuyeron desde la concentración más baja en que se evaluó. Se redujeron de un 20% hasta un 60%, siendo Nfx 5 μM , de la concentración en la que se presentó el pico más evidente de disminución.

Los resultados anteriores se pueden explicar e interpretar de la siguiente manera. En las vías metabólicas de las células, la concentración de cada metabolito intermediario depende del balance que existe entre su tasa de síntesis y su tasa de consumo (Nelson y Cox, 2015). Las concentraciones de Bnz menores a la IC₅₀, posiblemente, no fueron suficientes para provocar un estímulo en la síntesis del T(SH)₂. Por consiguiente, sus concentraciones disminuyeron como resultado de un posible aumento en su consumo provocado por la unión covalente a metabolitos electrofílicos derivados del fármaco y su consecuente expulsión

(Trochine et al.,2014) o por el etiquetado de proteínas con T(SH)₂ en respuesta al posible estrés oxidante que podría provocar el fármaco (tripanotiónilación de proteínas) (Ulrich et al., 2017). Sin embargo, la acumulación de Cys y GSH también podrían sugerir una posible disminución en la síntesis de T(SH)₂, ya sea porque se haya afectado la actividad de la TryS o debido a la limitación de los precursores poliaminas.

A concentraciones más altas de Bnz, el estímulo de estrés que provoca el fármaco podría ser suficiente para generar una respuesta compensatoria para incrementar la síntesis de GSH y T(SH)₂ dando como resultado la disminución simultánea de Cys. Alternativamente, se pudo activar otro mecanismo que llevara al aumento de estos dos metabolitos, tal como una disminución en la tasa de su consumo provocado por el daño a las enzimas dependientes del T(SH)₂. De manera muy relevante, en el tratamiento con el Bnz, los tioles totales parecen no modificarse drásticamente.

Estos datos contrastan con lo publicado previamente por Repetto en 1996 y Maya en 1997, en donde reportan que parásitos expuestos a 50 o 100 μ M de Bnz respectivamente, durante 2 h, disminuyen la concentración de tioles reducidos entre 60 y 80%. Al reducir enzimáticamente dichos tioles remanentes no se observaron cambios en sus concentraciones, con lo cual los autores sugieren que las concentraciones reportadas son las concentraciones de tioles totales.

Sin embargo, estos experimentos se realizaron en tiempos cortos y a concentraciones de 5 a 10 veces más altas que las utilizadas en este proyecto. En tratamientos agresivos de tiempos cortos, las pozas de T(SH)₂ disminuyen drásticamente, mientras que en tratamientos prolongados (24 h) y a dosis inhibitorias de crecimiento, los efectos del Bnz son opuestos a lo reportado.

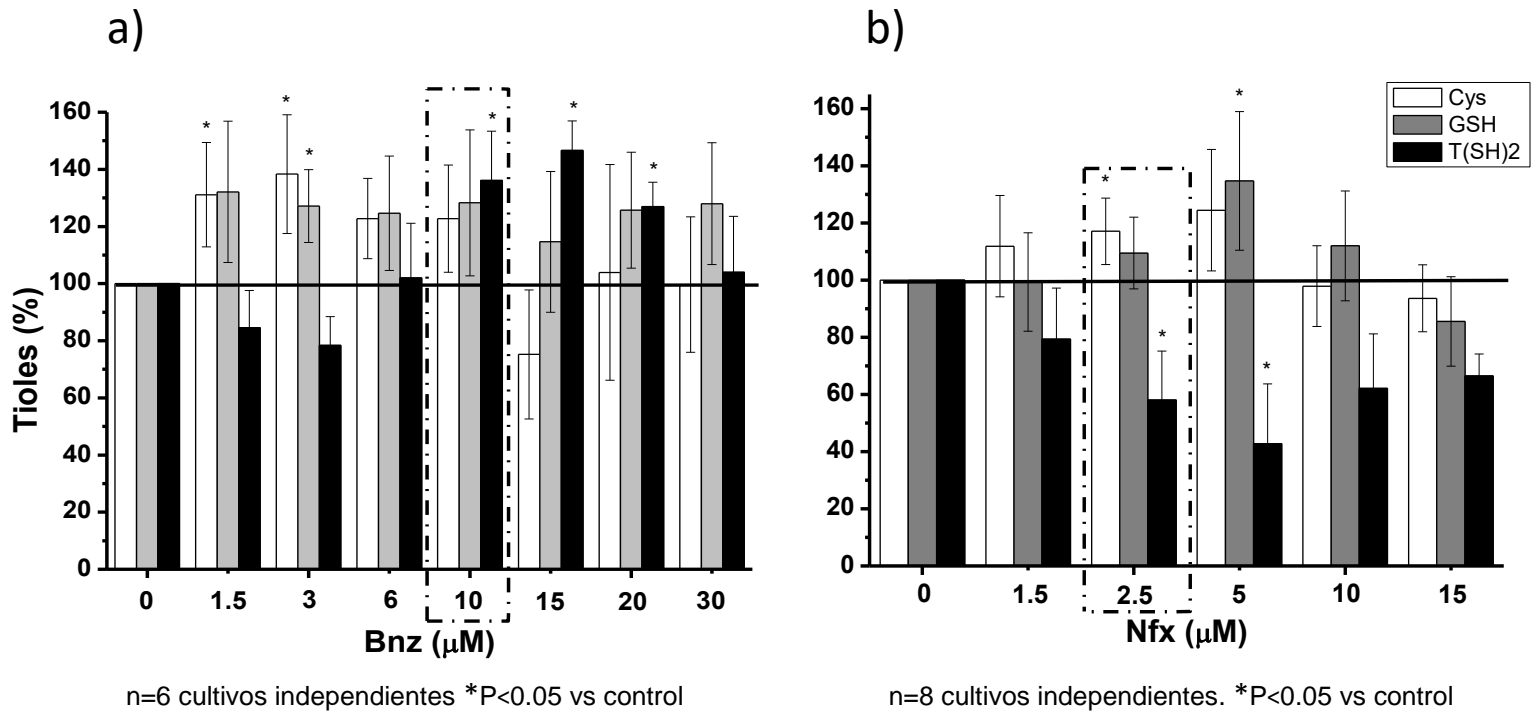


Figura 8.4 Perfil de tioles en parásitos expuestos a Bnz y Nfx. a) porcentaje de la concentración de tioles totales en parásitos expuestos 24 h a Bnz y b) porcentaje de la concentración de tioles totales en parásitos expuestos 24 h a Nfx. El cuadro punteado señala la concentración más cercana a la IC₅₀ de cada fármaco; IC_{50Bnz}=11μM, IC_{50Nfx}= 3 μM. 100% (nmol/mg proteína celular): Cys= 5.9 ±1.8; GSH=8.2±1.6; T(SH)₂=2.5±0.98.

Estas diferencias podrían explicarse considerando que la toxicidad de un compuesto en un sistema biológico depende de la concentración y el tiempo de exposición, además de posibles mecanismos compensatorios que pueden producirse en tiempos prolongados de exposición, tal como lo observaron Andrade et al. (2008) en epimastigotes y Rigalli et al. (2016) en células HepG2 expuestas a Bnz.

En comparación con los cambios observados en los tioles con el Bnz, en los parásitos expuestos a Nfx la tasa de síntesis del T(SH)₂ parece estar rebasada por la alta tasa de consumo de dicho metabolito, esto a pesar de existir altos niveles de Cys y GSH. La disminución en el T(SH)₂ puede deberse a que: 1) haya disminuido la tasa de su síntesis debido a una limitación de las poliaminas (Spd/Put), el otro precursor del metabolito, o a la inhibición de la TryS, o 2) que la tasa del consumo de T(SH)₂ haya aumentado ya sea por la producción de EROs o por la reducción secuencial del Nfx (Hall, 2011).

La oxidación excesiva del T(SH)₂, o su conjugación con metabolitos electrofílicos o con proteínas oxidadas producidas por el tratamiento con el Nfx, podrían inducir la expulsión del tripanotión oxidado o los conjugados, respectivamente, con el fin de mantener el balance redox de la célula (Mukhopadhyay et al., 1996; Perea et al., 2016; Perea et al., 2018). Sin embargo, que el efecto se vea reflejado sólo en el T(SH)₂, y no en la Cys o el GSH, probablemente se debe a que todo el sistema enzimático de desintoxicación de peróxidos (TXN, TXNPX, GPX, APX) depende casi exclusivamente del T(SH)₂ (Ollin-Sandoval, Moreno-Sánchez y Saavedra, 2010) (Fig. 1.9). Por ello, la disminución en las pozas de T(SH)₂ en los parásitos expuestos a Nfx podría ser principalmente a causa de la desintoxicación de las EROs o por el gasto de T(SH)₂ a causa de la reducción secuencial que sufre el Nfx (Hall, 2011).

El T(SH)₂ es el principal metabolito que protege al parásito contra el daño ocasionado por estrés oxidante gracias a las características fisicoquímicas que éste posee, como la formación favorecida del disulfuro por ser un ditiol y la carga

positiva de la Spd que le confiere mayor reactividad. La acumulación de Cys y GSH podría indicar el papel secundario de estos tioles en el proceso de defensa contra el estrés que provoca el Nfx.

La capacidad del Nfx para disminuir las pozas de T(SH)₂ podría ser la explicación del por qué este fármaco es más potente y también más tóxico; al disminuir las concentraciones del tiol no sólo compromete la capacidad antioxidante del parásito con la desintoxicación de peróxidos, sino que también podría estar afectando otras funciones celulares. Entre las posibles funciones celulares perjudicadas están: el metabolismo hierro-azufre de las metaloproteínas (Kumar et al., 2011), el cociente de NADPH/NADP⁺, la síntesis de desoxirribonucleótidos por disminuir hasta en un 60% las concentraciones de T(SH)₂ (Dormeyer et al., 2001), el UMSBP (proteína universal de unión a la secuencia del minicírculo, por sus siglas en inglés) involucrado en la iniciación de la replicación del cinetoplasto (Sela, Yaffe y Shlomai, 2008) y/o la tripanotiónilación de proteínas (Ulrich et al., 2017).

8.4 Dinámica de tioles en tiempos cortos de exposición a Bnz

Se exploró si en tiempos cortos de exposición a los fármacos las pozas de tioles se ven modificadas de manera similar a cuando los parásitos se exponen a 24 h o se comportaban según la bibliografía. Los parásitos se expusieron a 10 µM de Bnz ó a 3 µM de Nfx (IC₅₀) en medio LIT completo y se determinaron los tioles totales a diferentes tiempos (Fig. 8.5).

Para las muestras control sin el fármaco, se observó que las concentraciones de Cys tienden a aumentar durante las primeras 6 h de exposición. En el caso del GSH, se mantuvo relativamente constante durante las 24 h mientras que el T(SH)₂ disminuyó a partir de las 2 h. A las 24 h las pozas de este tiol disminuyeron un 70% con respecto a las concentraciones de T(SH)₂ de los parásitos en el tiempo cero.

Por otro lado, en los parásitos tratados con Bnz ó Nfx, el comportamiento de la Cys y el GSH es relativamente similar al control; sin embargo, se observa una tendencia en las pozas de $T(SH)_2$, estas decaen significativamente durante las primeras dos horas de exposición a los fármacos. Cualitativamente, a las 24 h existe un patrón similar a lo descrito en la Fig. 8.4, en la que la disminución del $T(SH)_2$ es mayor con el Nfx que con el Bnz.

En rutas metabólicas, las concentraciones de los intermediarios en estado estacionario se mantienen relativamente constantes (aunque diferentes para cada intermediario) (Nelson y Cox, 2015). Al ser el $T(SH)_2$ un metabolito tan esencial e importante para los procesos redox tendría que ser muy estable, a menos que haya un estrés intenso o una perturbación cuyo mecanismo de acción afecte de manera directa a este metabolismo. Como indican las exposiciones a 24 h, el mecanismo de acción del Bnz parece no tener efecto directo o dramático en las concentraciones de tioles totales, mientras que en el caso del Nfx, el cambio en las pozas del $T(SH)_2$ es más evidente, al parecer, por la pérdida del metabolito. Al respecto, cabe la posibilidad de que el metabolito oxidado se expulse al medio extracelular (Perea et al., 2018), pueda degradarse o unirse a proteínas. Se ha determinado que en condiciones de estrés las proteínas además de glutationilarse, también se pueden unir al $T(SH)_2$ (tripanotionilación) (Ulrich et al., 2017).

Una vez más, pareciera que el comportamiento de los metabolitos con grupos tiol no coincide con lo citado en la literatura; sin embargo, aunque el tiempo de exposición coincide, las concentraciones que se utilizaron fueron diez veces menores, por lo que no habría que esperar los mismos resultados.

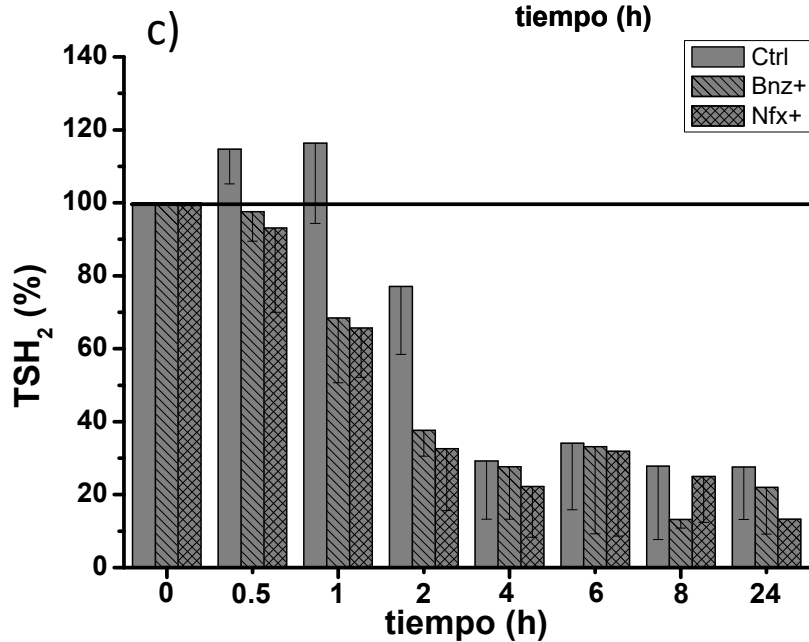
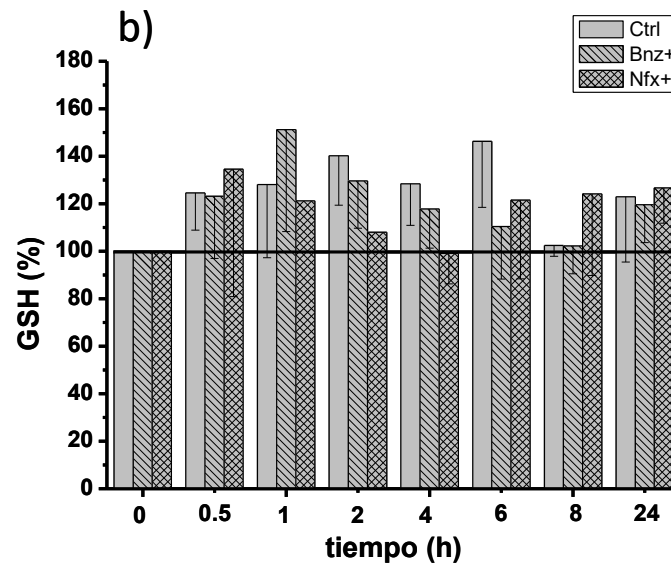
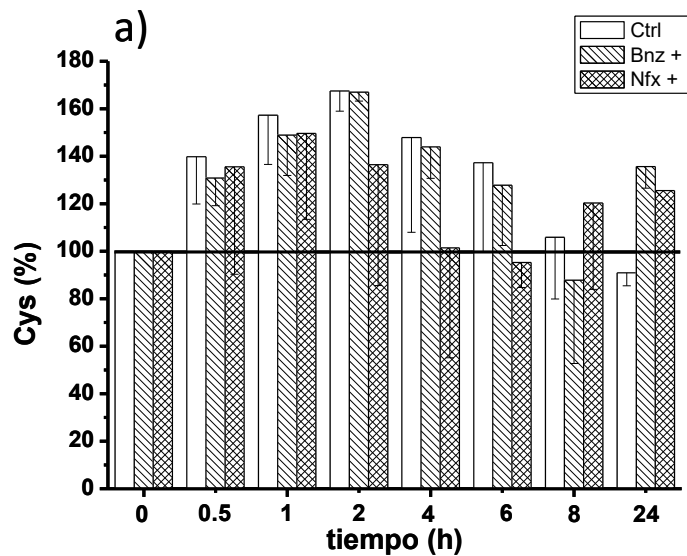


Figura 8.5 Perfiles temporales de tioles totales en epimastigotes de *T. cruzi* expuestos a 10 μM de Bnz o 3 μM de Nfx. Se muestran los cambios en porcentaje, de las concentraciones de a) Cys, b) GSH y c) T(SH)₂ con respecto al tiempo cero de exposición. n=3-5 cultivos independientes. 100%(nmol/mg proteína): Cys=7 \pm 1; GSH=12 \pm 2; T(SH)₂=4 \pm 2.

8.5 Efecto de los fármacos en las pozas de poliaminas

Para determinar si los cambios que presentaron las pozas de T(SH)₂ por el tratamiento de los fármacos se debían a una limitación en el abastecimiento del segundo precursor, la Spd, y a su vez de su precursor Put, estos metabolitos se determinaron en paralelo y los resultados se muestran en la Figura 8.6.

En el caso del Bnz, las concentraciones de Put mostraron un patrón de aumento en los parásitos, pero sin diferencias significativas. Así también, se observaron fluctuaciones en las concentraciones de Spd con tendencia a disminuir en las concentraciones cercanas a la IC₅₀ siendo estadísticamente significativas en las concentraciones de 10 y 15 μM. Esto es coherente con el aumento de T(SH)₂ registrado en esas mismas concentraciones: las concentraciones de Spd disminuyeron debido a que su demanda aumentó, por un incremento en la síntesis de T(SH)₂.

La poza de Put en los parásitos expuestos 24 h a Nfx no mostró cambios relevantes, mientras que la Spd mostró una tendencia al aumento y los cambios fueron estadísticamente significativos en las concentraciones de 2.5 y 5 μM de Nfx, lo que podría sugerir una disminución en la síntesis de T(SH)₂. Sin embargo, dichos cambios no fueron mayores al 30% (Fig. 8.6).

Por lo tanto, la disminución del T(SH)₂ en las concentraciones menores a la IC₅₀ del Bnz y en todas las concentraciones de Nfx que se evaluaron, no se debe a la restricción de poliaminas ya que éstas se encuentran en concentraciones similares o en exceso con respecto a sus respectivos controles. Esto indica que las poliaminas no son limitantes para la síntesis de T(SH)₂.

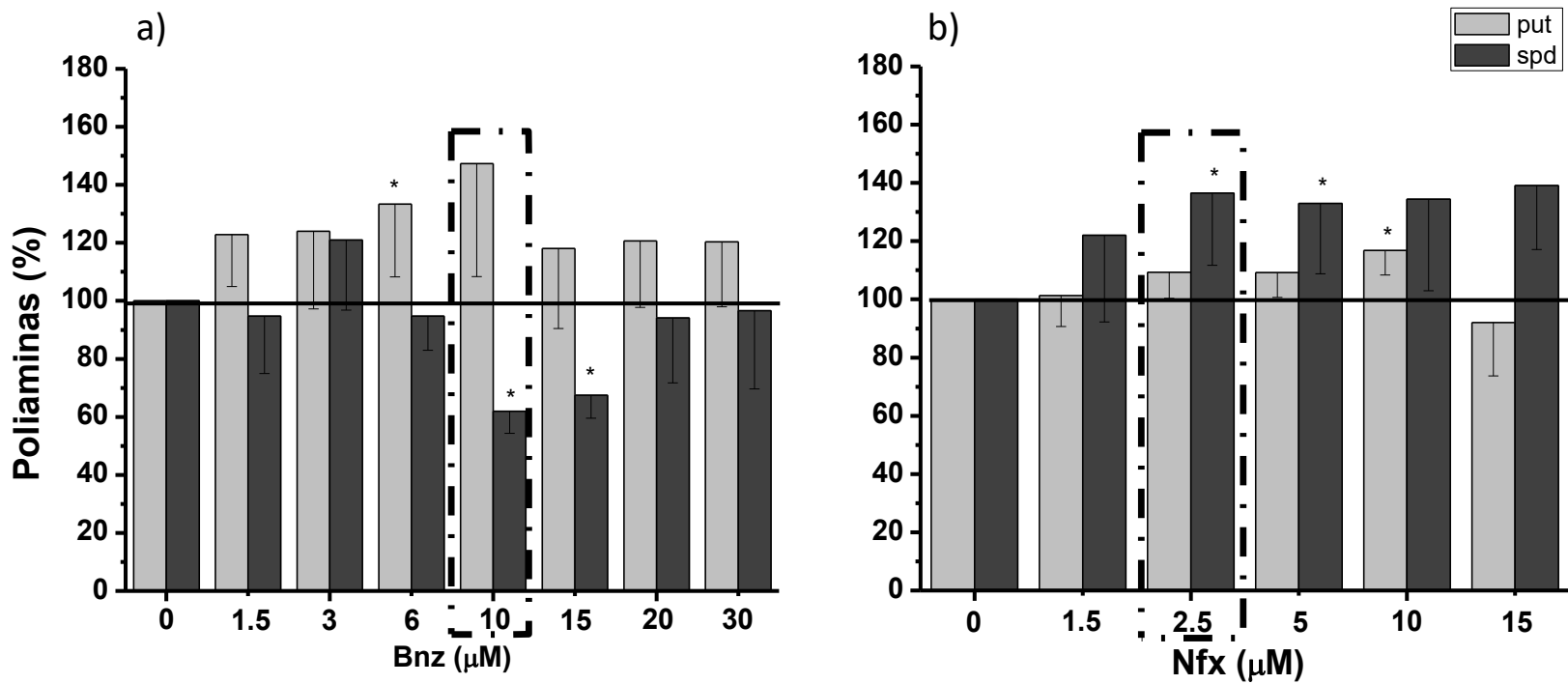


Figura 8.6 Perfil de poliaminas en porcentaje de epimastigotes expuestos 24 h a diferentes concentraciones de a) Bnz y b) Nfx. Los nmoles totales de los metabolitos se normalizaron por la concentración de proteína total. n=6 cultivos independientes de parásitos. 100%(nmoles/mg proteína) Put= 8.2±2 y Spd=19±3.

8.6 Efecto del tratamiento con los fármacos en las actividades enzimáticas de la vía metabólica antioxidante del parásito

Se evaluó si los parásitos tratados con Bnz o Nfx mostraban cambios en las actividades de las enzimas involucradas en el metabolismo del tripanotión (Fig. 8.7). En los parásitos expuestos 24 h a Bnz, la actividad de la TryR no mostró diferencias significativas ni patrones de cambio. De manera muy interesante, la TXN y la TXNPx mostraron una tendencia a disminuir sus actividades mientras que la GS presentó una tendencia a incrementarse sólo en la concentración de 30 μ M.

La TXN es un componente que controla el flujo de reducción de peróxidos (González-Chávez et al., 2015; González-Chávez et al., 2019), además de transferir equivalentes reductores del T(SH)₂ a múltiples proteínas blanco como a peroxiredoxinas, a la ribonucleótido reductasa o al UMSBP (Dormeyer et al., 2001; Sela, Yaffe y Shlomai, 2008). La disminución del 95% en la concentración de TXN citosólica (cTXN) incrementa 4 veces la concentración de T(SH)₂ y 2 veces la de GSH tras 24 h de inducción de ARNi. Esta disminución en la expresión de la TXN afectó la capacidad de desintoxicación de H₂O₂ en el parásito *T. brucei* (Comini, Krauth-Siegel y Flohé, 2007). Con dichos antecedentes, se puede especular que la acumulación de T(SH)₂ en dosis de Bnz mayores a la IC₅₀ (Fig. 8.4), puede deberse a que el sistema de desintoxicación de peróxidos se encuentra comprometido y el T(SH)₂ no pueda utilizarse para reducir a los peróxidos. Desafortunadamente, las actividades de las enzimas gECS y TryS están debajo del límite de detección del ensayo, por lo que no se sabe si cambiaron, a diferencia de la GS que no mostró cambios significativos.

En el caso del tratamiento con el Nfx, los parásitos no presentaron cambios significativos en las actividades a concentraciones menores de la IC₅₀; sin embargo, a concentraciones mayores, la GS y la TryR presentaron una tendencia a la baja mientras que la TXN y TXNPx se afectaron menos (Fig. 8.7). La relativamente poca afectación de la TXN y la TXNPx podría ser parte de la explicación de la disminución de la poza de T(SH)₂ (Fig. 8.4).

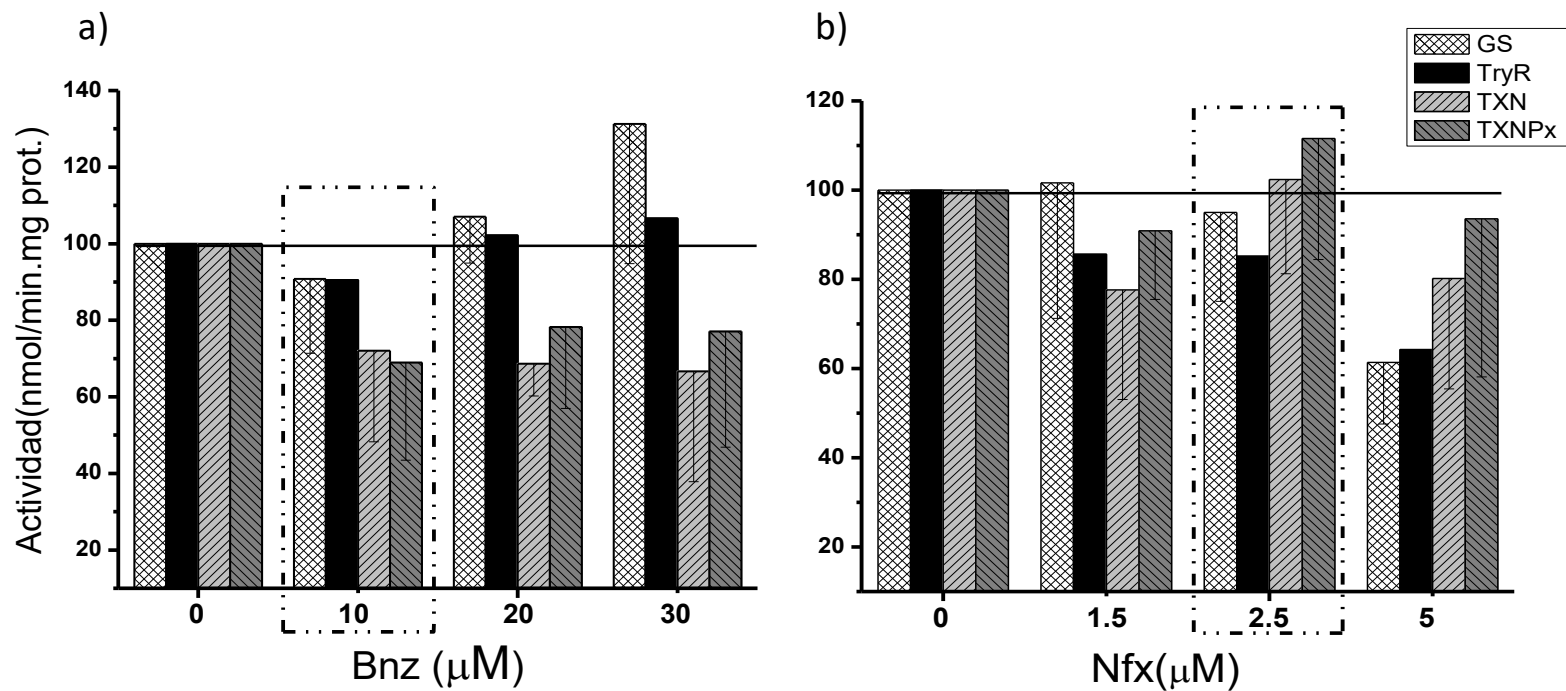


Figura 8.7 Determinación de actividades enzimáticas. Porcentaje de las actividades enzimáticas de la fracción citosólica de epimastigotes expuestos 24 h a los fármacos a) Bnz y b) Nfx. 100% (nmol/min.mg proteína de extracto celular): Determinados: TryR= 267 ± 97 ; TXN= 35 ± 9 ; TXNPx= 119 ± 39 ; GS= 14 ± 6 . Reportados: GS= 8.6 ± 2.3 ; TryR= $264 \pm 150/195 \pm 60$; TXN= 88 ± 14 ; TXNPx= $177 \pm 9/179 \pm 42$ (Olin-Sandoval, et al., 2012; González-Chávez et al., 2015).

Las enzimas implicadas en la reducción de los peróxidos (TXN, TXNPx) no se encontrarían afectadas, mientras que la TryR, aunque está parcialmente inhibida, es la enzima que más actividad presenta en este sistema reductor de peróxidos. Por lo tanto, si el Nfx genera ROS, el sistema enzimático de reducción de peróxidos, en términos generales, se encuentra en condiciones basales; por lo que utilizaría activamente y de manera eficiente al T(SH)₂ para reducir los peróxidos (Olin-Sandoval, Moreno-Sánchez y Saavedra, 2010), con la concomitante oxidación y probable pérdida del mismo.

El análisis de las enzimas del metabolismo de síntesis y consumo del T(SH)₂ sugieren fuertemente que los mecanismos citotóxicos del Bnz y del Nfx son diferentes. Aunque los efectos del Bnz requieren más estudios, los datos de esta tesis sugieren que el Nfx genera estrés oxidante al utilizar de manera muy activa al T(SH)₂.

8.7 Efecto del tratamiento de los fármacos en el flujo de reducción de peróxidos

Los parásitos tratados con Bnz mostraron una disminución en el flujo *ex vivo* (flujo medido en extractos celulares) de reducción de peróxidos de alrededor de un 30% en la concentración más alta que se evaluó (20 µM) (Fig. 8.8). Esto podría sugerir que la disminución que presentaron los parásitos en la actividad de la TXN y la TXNPx (20-40%) después del tratamiento con el fármaco, es suficiente para disminuir el flujo de la vía metabólica. Estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente en nuestro laboratorio, donde se determinó que la TXN tiene un alto control del flujo metabólico de esta vía (González-Chávez et al., 2015, González-Chávez et al., 2019).

En relación con el flujo *ex vivo* de reducción de peróxidos en parásitos tratados con Nfx, este no cambió significativamente (Tabla 3) lo que concuerda con el hecho de que la TXN y la TXNPx, las enzimas directamente responsables de la reducción del peróxido, mantuvieron su actividad hasta 5 µM de Nfx (Figura 8.7). Estos datos coinciden con el efecto propuesto para el Nfx, el cual provoca un ciclo redox de generación de ROS

Tabla 3. Efecto de los fármacos en el flujo metabólico de reducción de peróxidos.

Fármacos (μM)	J nmoles/min*mg de proteína
Ctrl	3.2 \pm 1
Bnz	
10	3 \pm 1.2
20	2.3 \pm 0.6
Nfx	
3	3.8 \pm 1.6
5	3.6 \pm 1.6

Tabla 3. Efecto de los fármacos en el flujo metabólico de reducción de peróxidos tras 24 h de exposición a Bnz ó Nfx. n=4 experimentos de cultivos independientes.

(Maya et al., 2007) estimulando el uso del T(SH)₂, provocando una disminución en la poza de este metabolito debido a su expulsión en forma de TS₂ (Fig. 8.4) (Perea et al., 2018).

Cabe resaltar, aunque hubo una disminución del 50% en la actividad de la TryR con el tratamiento con Nfx (Fig. 8.7), el 50% remanente de la actividad de la enzima todavía representa un exceso con respecto a las actividades de la TXN y la TXNPx (González-Chávez et al., 2015), lo que podría explicar el por qué a pesar de una disminución tan evidente en la TryR, no se afectó el flujo *ex vivo* de reducción de peróxidos cuando los parásitos se trataron con Nfx (Fig. 8.8).

Estos resultados indican que los fármacos tienen un efecto diferente en el metabolismo antioxidante del parásito. Mientras que el principal efecto del Bnz es mediante la inhibición de la TXN y la TXNPx (muy probablemente por la conjugación del

fármaco con la TXN principalmente) el efecto tóxico más evidente del Nfx es la disminución en la poza del T(SH)₂, posiblemente por una oxidación excesiva del metabolito, que lleva a su expulsión de la célula en su forma oxidada como disulfuro de T(SH)₂ (Perea et al., 2018).

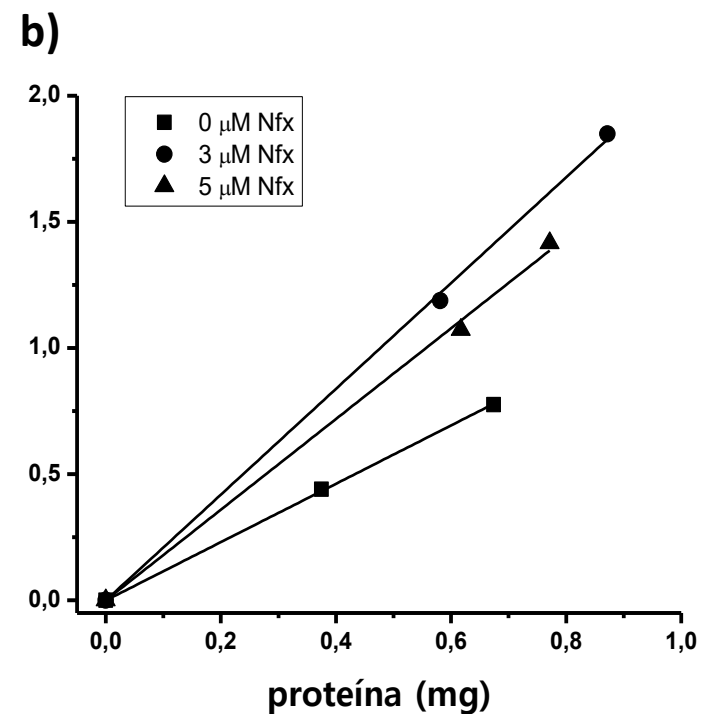
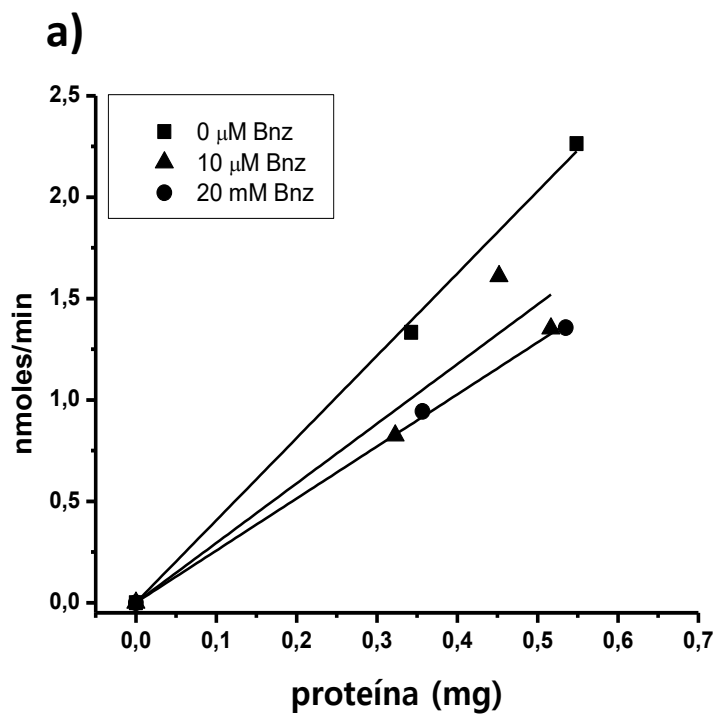


Figura 8.8 Ajustes representativos del flujo metabólico de desintoxicación de peróxidos de parásitos expuestos 24 h a) Bnz y b) Nfx. n=4 experimentos de cultivos independientes.

9. CONCLUSIONES GENERALES

Se determinó que a concentraciones por arriba de 30 μM de Bnz se compromete la viabilidad de los parásitos. Esto correlacionó con una disminución en las concentraciones intracelulares de ATP. Por lo tanto, en este proyecto de maestría se evaluaron concentraciones inhibitorias del crecimiento celular, debido a que no es posible hacer estudios en células metabólicamente inactivas.

La tendencia al aumento en la síntesis de GSH y T(SH)_2 en los parásitos tratados con Bnz por tiempos largos (Fig. 8.4 y 9.1), podría indicar la presencia de mecanismos compensatorios que no se habían podido observar con las exposiciones realizadas en tiempos cortos que se han reportado en la literatura (Repetto et al., 1996; Maya et al., 1997; Faundez et al., 2005). Así mismo, parece ser que hay un incremento en la actividad de la GS, lo que podría inducir un incremento en la síntesis de T(SH)_2 y una consecuente disminución en las concentraciones de poliaminas. Sin embargo, no se pudieron detectar las actividades de la gECS y la TryS para poder comprobar esta hipótesis. Tampoco fue posible evaluar cambios en la cantidad de proteína debido a que no se cuentan con anticuerpos para dichas enzimas.

Los resultados a tiempos cortos de exposición al Bnz (Fig. 8.5) sugieren que, aunque aumenten parcialmente la Cys y el GSH, el Bnz pareciera no actuar directamente a través de la disminución de la poza de T(SH)_2 del parásito, ya que la dinámica de este último metabolito, podría ser propia de los parásitos en crecimiento. Sin embargo, y de manera muy interesante, la TXN disminuyó su actividad reductora en los parásitos tratados desde concentraciones bajas de Bnz. Por lo tanto, el efecto del Bnz en el metabolismo antioxidante de *T. cruzi* se debe a que las principales enzimas/proteínas responsables de la desintoxicación de peróxidos se encuentran inhibidas y, entonces, no hay quien pueda tomar o usar el T(SH)_2 disminuyendo el flujo de reducción de peróxidos (Fig. 9.1).

En cuanto al efecto del Nfx que disminuye la concentración de T(SH)_2 (Fig. 8.4 y 9.1), se puede teorizar que el sistema de desintoxicación de peróxidos dependiente del

T(SH)₂ sí tiene un papel central en el parásito para contender contra este fármaco. La disminución en la poza del T(SH)₂ puede deberse a un alto consumo de dicho metabolito por un sistema enzimático de desintoxicación de peróxidos eficiente debido a que las actividades reductoras de la TXN y la TXNPx no se afectaron (Fig. 8.7), aunado a que la TXN tiene el mayor control de la vía de desintoxicación de peróxidos (González-Chávez et al., 2015 y González-Chávez et al., 2019). Esta alta eficiencia en el consumo del T(SH)₂ podría resultar contraproducente en los parásitos tratados con Nfx, volviéndolos más sensibles al estrés por EROs, producido por el sistema inmune del hospedero, debido a que los parásitos tienen poco T(SH)₂.

Además de un aumento en la demanda del T(SH)₂, no se podría descartar la posible inhibición de las enzimas responsables de la síntesis de T(SH)₂ (γ -ECS y/o TryS), debido a la acumulación que se observó de todos los precursores del T(SH)₂.

De manera general, se puede decir que las poliaminas no tienen un papel limitante en la síntesis de T(SH)₂ en parásitos tratados con el Bnz o el Nfx (Fig. 8.6). En ambos casos las pozas de las poliaminas Put y Spd se mantuvieron relativamente estables, en intervalos de concentración mM, mientras que las pozas de Cys podrían ser limitantes para la síntesis de T(SH)₂, ya que ésta se encuentra en intervalos de concentración menores a 1 mM.

El entendimiento de los mecanismos citotóxicos diferenciales de los fármacos que actualmente se utilizan para el tratamiento contra la infección por *T. cruzi*, nos puede ayudar a entender también los posibles mecanismos citotóxicos en las células del hospedero. Este conocimiento nos podría facilitar a establecer nuevas estrategias terapéuticas mediante la modificación de los regímenes terapéuticos de estos fármacos.

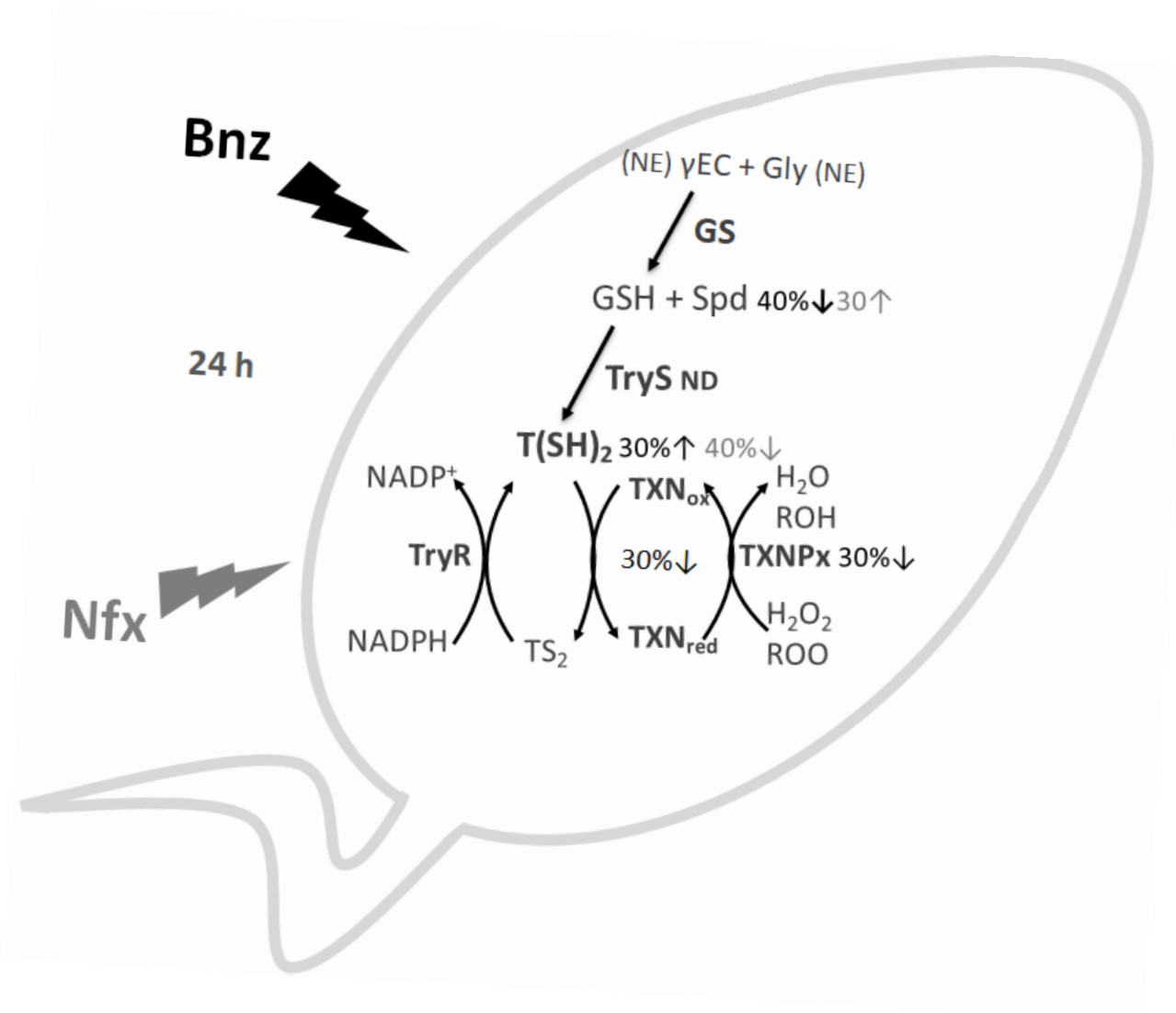


Figura 9.1 Efectos del Bnz y del Nfx en el metabolismo antioxidante de *T. cruzi*. Cambios del sistema antioxidante de *T. cruzi* al exponer parásitos 24 h a 10 y 3 μ M de Bnz y Nfx, respectivamente.

10. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

-Evaluar marcadores de estrés oxidante. Debido a que existe el debate si el Bnz y el Nfx causan estrés oxidante, se debe determinar en los parásitos tratados con estos fármacos índices de estrés oxidante, tales como carbonilación de proteínas, producción de malondialdehído y estados oxidado/reducido de los metabolitos con grupos tiol. La predicción es que los parásitos tratados con Nfx tendrán mayores índices de estrés oxidantes que los tratados con Bnz. Esto de acuerdo con los resultados de esta tesis.

- Evaluar el efecto de los fármacos en enzimas recombinantes con extractos celulares de parásitos expuestos al Bnz/Nfx.

-Analizar si existen cambios a nivel transcripcional y niveles de proteínas de las enzimas del metabolismo antioxidante en respuesta al tratamiento con los fármacos para identificar posibles mecanismos compensatorios de síntesis de *ново* de enzimas. Aunque se pudo determinar que hubo un incremento en la actividad de la GS con el tratamiento con Bnz, no se puede descartar que haya habido incrementos en las actividades de las enzimas involucradas en la síntesis de T(SH)₂. Se sabe que las enzimas que controlan principalmente la síntesis de este metabolito son la γ -ECS y la TryS (Olin-Sandoval et al., 2012; González-Chávez et al., 2019). Sin embargo, si hubo incremento en estas actividades, estos no fueron mayores a los límites de detección de los ensayos enzimáticos y, por lo tanto, no fueron detectables. No obstante, es sabido que incrementos leves en las actividades de enzimas que tienen por arriba del 50% del control del flujo de una vía metabólica tiene repercusiones importantes en el flujo de la misma. El análisis teórico dice que un incremento del doble de una enzima que tiene un coeficiente de control del 50% incrementará en 50% el flujo total de la ruta metabólica. Por lo tanto, incrementos en las actividades de la γ -ECS o TRyS en principio pueden aumentar de manera significativa la síntesis de T(SH)₂. En ese sentido, es importante determinar si los contenidos de proteína de estas enzimas se incrementan con el tratamiento con los fármacos.

- Obtener cepas de *T. cruzi* que sobre expresen γ -EC y TryS para evaluar el efecto del Nfx en dichas enzimas y evaluar si son más resistentes al fármaco.

-Determinar por qué disminuye la concentración de T(SH)₂ en los parásitos expuestos a Nfx. Este punto es muy relevante, ya que la pérdida del T(SH)₂ pudiera deberse a una oxidación excesiva del metabolito y su posterior expulsión de la célula para mantener la proporción reducida/oxidada de este metabolito (Perea et al., 2018). Asimismo, también pueden existir procesos de tripanotilación de proteínas, lo cual ha sido demostrado hasta recientes fechas (Ulrich et al., 2017).

11. REFERENCIAS

- Andrade, H.M., Murta, S.M., Chapeaurouge, A., Perales, J., Nirdé, P. y Romanha, A.J. (2008). Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Resistance to Benznidazole. *J Proteome Res.* 7(6): 2357-2367.
- Altcheh, J. 2015. "Chagas Congénito" ponencia presentada en Cumbre Latinoamericana de la Enfermedad de Chagas, Ciudad de México, 17-18 julio del 2015.
- Begon, M., Harper, J. y Townsend, C. 1988. ECOLOGIA: individuos, poblaciones y comunidades. Omega. Barcelona. 886pp.
- Boiani, M., Piacenza, L., Hernández, P., Boiani, L., Cerecetto, H., González, M. y Denicola, A. (2010). Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? *Biochem. Pharmacol.* 79(12):1736-45.
- Carrillo, C., Cejas, S., González, N. S. y Algranati, I.D. (1999). *Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. *FEBS J.* 454:192-196.
- 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. *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 morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1:159-218.
- Comini, M.A., Krauth-Siegel, R.L. y Flohé, L. (2007). Depletion of the thioredoxin homologue tryparedoxin impairs antioxidative defence in African trypanosomes. *Biochem. J.* 402:43-49.
- Docampo, R., Moreno, S.N.J., Stoppani, A.O.M., Leon, W., Cruz, F.S., Villalta, F. y Muniz, R.F.A. (1981). Mechanism of Nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Pharmacol.* 30(14):1947-1952.
- Dormeyer, M., Reckenfelderböumer, N., Lüdemann, H. y Krauth-Siegel, R.L. (2001). Trypanothione-dependent Synthesis of Deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* Ribonucleotide Reductase. *J. Biol. Chem.* 276:10602-10606.
- 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.

- Goijman, S. G. y Stoppani, A.O.M. (1985). Effects of Nitroheterocyclic Drugs on Macromolecule Synthesis and Degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Pharmacol.* 34(8): 1331-1336.
- González-Chávez, Z.A., Olin-Sandoval, V., Rodríguez-Zavala, J.S., Moreno-Sánchez, R. y Saavedra, E. (2015). Metabolic control analysis of the *Trypanosoma cruzi* peroxide detoxification pathway identifies tryparedoxin as a suitable drug target. *BBA gen.* 1850:263-273.
- González-Chávez, Z., Vázquez, C., Mejía-Tlachi, M., Márquez-Dueñas, C., Manning-Cela, R., Encalada, R., Rodríguez-Enríquez, S., Michels, P.A.M., Moreno-Sánchez, R. y Saavedra, E. (2019). Gamma-glutamylcysteine synthetase and tryparedoxin 1 exert high control on the antioxidant system in *Trypanosoma cruzi* contributing to drug resistance and infectivity. *Redox Biol.* 26: 101-231.
- Gorla, D. and Noireau, F. (2010). Geographic distribution of Triatominae vectors in América. En Telleria, J. and Tibayrenc, M. Ed. *American trypanosomiasis (Chagas disease). One hundred years of research.* 1ª ed. Elsevier, Burlington (VA), EU: p. 209-231.
- Hall, B.S. y Wilkinson S.R. (2011). Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. *aac.* 56(1): 115-123.
- Kirchhoff, 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., Igarria, A., D`autreux, 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 J.* 30:2044-2056.
- 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.
- Liu, D. (1981). A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol.* 26(2):145-149.
- Liu, Q. y Zhou, X.N. (2015). Preventing the transmission of American trypanosomiasis and its spread into non-endemic countries. *Infect. Dis. Poverty.* 4:60.
- 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} PEARSON, España: 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.

- Moreno, S.N.J. (1988). The reductive metabolism of nifurtimox and benznidazole in *Crithidia fasciculata* is similar to that in the *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 91(2):321-325.
- Moreno, S.N.J., Docampo, R., Mason, R.P., Leon, W. y Stoppani, A.O.M. (1982). Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch. Biochem. Biophys.* 218: 585-591.
- Mukhopadhyay, R., Dey, S., Xu, N., Gage, D., Lightbody, J. Ouellette, M. y Rosen B. (1996). Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 10383-10387.
- 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. (2018). ¿Por qué se les dice “desatendidas” a algunas enfermedades tropicales? Actualizada 19 enero 2012. Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/58/es/>
- Perea, A., Manzano, J.I., Castanis, S. y Gamarro, F. (2016). The LABC2G2 Transporter from the Protozoan *Leishmania* is involved in Antimony Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 60:3489-3496.
- Perea, A., Manzano, J.I., Kimura, Y., Ueda, K., Castanys, S. y Gamarro, F. (2018). *Leishmania* LABC2G2 transporter is involved in ATP- dependent transport of thiols. *Biochem J.* 475:87-97.
- Persson, L. (2007). Ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase in trypanosomatids. *Biochem Soc Trans.* 35: 317-17.
- Pillay, C.S., Hofmeyr, J.H. y Rohwer, J.M. (2011). The logic of kinetic regulation in the thioredoxin System. *BMC Syst Biol.* 25: 5-15.
- Pineda, E., Encalada, R., Vázquez, C., Néquiz, M., Olivos-García, A., Moreno-Sánchez, R. y Saavedra, E. (2015). In vivo identification of the steps that control energy metabolism and survival of *Entamoeba histolytica*. *FEBS J.* 282(2): 318-31.
- 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. *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.
- Rigalli, J.P., Perdomo, V.G., Ciriaci, N., Antonio-Francés, D.E., Ronco, M.A., Bataille, A.M., Ghanem, C.I., Ruíz, M.L. Manautou, J.E. y Catania, V.A. (2016). The trypanocidal benznidazole promotes adaptive response to oxidative injury: involvement of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) and multidrug resistance associated protein 2 (MRP2). *TAAP*. 304: 90-98.
- 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.
- Schmunis, G.A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in nonendemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102:75-85.
- Sela, D., Yaffe, N. y Shlomai, J. (2008). Enzymatic Mechanism Controls Redox-mediated Protein-DNA Interactions at the Replication Origin of Kinetoplast DNA Minicircles. *J. Biol. Chem.* 283(46):32034-32044.
- Silva-Carmona, A. (2016). Evaluación del efecto del Benznidazol en el metabolismo antioxidante de *Trypanosoma cruzi*. F.C. UNAM CdMx. 67pp.
- Trochine, A., Creek, D.J., Faral-Tello, P., Barrett, M.P. y Robello, C. (2014). Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed 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.
- Ulrich K, Finkenzeller C, Merker S, Rojas F, Matthews K, Ruppert T, Krauth-Siegel RL. *Antioxid Redox Signal.* (2017). Stress-Induced Protein S-Glutathionylation and S-Trypanothionylation in African Trypanosomes-A Quantitative Redox Proteome and Thiol Analysis. *Antioxid. Redox Signal.* 27, 517-533.
- Vázquez, C., Mejía-Tlachi, M., González-Chávez, Z., Silva, A., Rodríguez-Zavala, J.S., Moreno-Sánchez, R. y Saavedra, E. (2017). Buthionine sulfoximine is a multitarget inhibitor of trypanothione synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* 591(23): 3881-3894.
- 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 (2018). Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>