

302827



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

12
249

ACTIVIDAD DEL GOSIPOL Y UN ANALOGO SOBRE UNA CEPA DE
TRYPANOSOMA CRUZI AISLADA EN MEXICO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :

ANA MARIA DEL ROCIO HERNANDEZ DUEÑAS

MEXICO, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

El presente trabajo forma parte de los proyectos 942448 y 951781 del programa de investigación financiado por el DEPI - IPN "Estudio de los transmisores y del agente etiológico de la Enfermedad de Chagas", realizados en el Departamento de Parasitología de la E.N.C.B. - IPN, bajo la dirección del Dr. Benjamín Noguea Torres.

*Lo importante del hombre no es vencer , sino
lograr y su razón de existir no sólo es
buscar y encontrarse, sino ser, siendo inicio y
final, morir y renacer , y el tiempo y el
lugar a cada paso, llevando la capacidad
de dar.*

-Emilio Rojas-

A DIOS.

por permitirme llegar a este momento importante de mi vida.

A MIS PADRES.

por darme la vida, al igual que su amor y comprensión.

A MIS HERMANOS.

porque sin su ayuda no hubiera llegado hasta esta meta.

A MIS PROFESORES Y TUTORIALES.

*por su tiempo y dedicación a la educación de sus alumnos,
en especial al Profesor Benjamín Hoqueada Torres.*

A MI TIA ESTREZUELA DUEÑAS.

*por transmitirme sus conocimientos y experiencias, de gran utilidad para
mí.*

A TODOS MIS AMIGOS.

por su cariño y amistad, que será para siempre.

A AZUELOS QUE NO ESTAN CONTIGO

desde hace tiempo. y espero que desde donde se encuentren iluminen el camino que he de recorrer para poder ser como ellos.

EN ESPECIAL A M. SIGMUND.

por tu apoyo incondicional, por creer en mí y por estar siempre a mi lado.

INDICE

CAPITULO I	INTRODUCCION.	PAGINA
1.1	Planteamiento del problema	2
1.2	Objetivos	3
1.3	Hipótesis	3
CAPITULO II	ANTECEDENTES.	
2.1	Enfermedad de Chagas	5
2.2	Agente etiológico	
2.2.1	Características	6
2.2.2	Ciclo de vida.	7
2.2.3	Metabolismo	9
2.2.4	Sistema de reoxidación del NADH glucolítico	14
2.3	Aislamiento de las fases extracelulares.	14
2.3.1	Separación por centrifugación diferencial	14
2.3.2	Separación a través de cargas eléctricas	15
2.3.3	Separación a través de intercambiadores iónicos	16
2.4	Inhibición de la enzima α -hidroxiácido deshidrogenasa	17
CAPITULO III	PARTE EXPERIMENTAL	
3.1	Diagrama de flujo general	22
3.2	Material, reactivos y equipo	

3.2.1	Material biológico.	23
3.2.2	Material de laboratorio.	23
3.2.3	Reactivos	24
3.2.4	Equipo	25
3.2.5	Preparación de soluciones	25
3.3	Metodología	
3.3.1	Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
3.3.2	Aislamiento de tripomastigotes metacíclicos en medios de cultivo	27
3.3.3	Cosecha de <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
3.3.4	Determinación de la actividad enzimática de la α -hidroxiácido deshidrogenasa	29
3.3.5	Determinación del efecto inhibitor del gopisol y 4-ISA sobre la enzima α -hidroxiácido deshidrogenasa	29
3.3.6	Determinación de la susceptibilidad de las fases epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos al gopisol y 4-ISA	30

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1	Resultados	32
4.2	Discusión	39

CAPITULO V CONCLUSIONES.

5.1	Conclusiones	43
-----	--------------	----

BIBLIOGRAFIA.	44
----------------------	-----------

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es ocasionada por *Trypanosoma cruzi*, exclusiva del continente Americano; aunque peligrosa en su fase aguda más bien es una enfermedad gradualmente crónica. Su distribución abarca una extensa área de la América tropical que va desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el norte de Argentina, a excepción de Surinam y Guyana, presentándose principalmente en poblaciones rurales que habitan en viviendas de construcción deficiente. (35)

La trascendencia de esta enfermedad radica en que su agente etiológico invade el corazón y otras vísceras de los huéspedes vertebrados, causando cuadros clínicos graves que con frecuencia conducen a la muerte. El padecimiento es de alta prevalencia en América, existiendo al menos 20 millones de personas infectadas (5). En México se puede considerar la enfermedad de Chagas como una endemia, existiendo zonas geográficas en que la parasitosis es un problema de salud pública. (43)

La enfermedad se conoce en México desde 1940 cuando Mazzotti reportó por primera vez dos casos humanos procedentes de Teojomulco, Oaxaca. A partir de entonces varios investigadores (Velasco) han trabajado sobre éste padecimiento, realizando diversos estudios encaminados a conocer la distribución e importancia de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. (39)

Diferentes medicamentos se han diseñado y probado contra *T. cruzi* pero ninguno de ellos ha sido completamente efectivo para el tratamiento en humanos. Además no se cuenta aún con vacunas y los programas de control de transmisores están avocados más a cuestiones políticas que técnicas. (45)

Lo anteriormente expuesto puede explicar el porque *T. cruzi* es uno de los organismos más estudiados en los laboratorios de investigación en el mundo.

En la naturaleza *T. cruzi* presenta diferentes fases dependiendo del huésped en que se localice (vertebrado o invertebrado) y si está dentro o fuera de las células de los vertebrados (localización intra y extracelular, respectivamente). Cada una de las fases tiene características biológicas distintas, por lo que se requiere estudiar en forma individual cada una de ellas. Por tal motivo en el presente trabajo se obtienen por separado a las distintas fases extracelulares de *T. cruzi* y se evalúa su susceptibilidad a dos fármacos que se consideran como posibles tripanomicidas efectivos.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la actividad tripanomicida del gopipol y un compuesto derivado de éste (4-Isopropil salicil aldehído) sobre *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos particulares:

1. Evaluar la actividad tripanomicida del gopipol y su derivado sobre epimastigotes.
2. Evaluar la actividad tripanomicida del gopipol y su derivado sobre tripomastigotes metacíclicos.
3. Observar la actividad del gopipol y su derivado sobre la enzima α -hidroxiácido deshidrogenasa.

1.3 HIPOTESIS

Si la parte del isopropilsalicil aldehído de la estructura del gopipol es la responsable de la actividad tripanomicida, entonces un análogo estructural de éste, deberá actuar de manera similar al gopipol.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS

La infección de seres humanos por *Trypanosoma cruzi* provoca la enfermedad de Chagas. Desde su descubrimiento por el doctor Carlos Chagas, esta zoonosis ha marcado un hito dentro de la parasitología, ya que fue el primer caso en que se describe al agente etiológico, luego al transmisor y finalmente a la enfermedad que ocasiona. (28)

Este parásito intracelular ataca particularmente el miocardio, esófago y colon. Es transmitida generalmente en las materias fecales de un artrópodo, pero también puede ser adquirida por vía placentaria, por conducto de la leche materna, por transfusión sanguínea, al desollar animales silvestres o ingerirlos semicrudos, por la falta de cuidado en el trabajo del laboratorio y por el trasplante de órganos. (44)

Originalmente fue una enzootia silvestre, pero a medida que el hombre invadió y degradó los ecosistemas naturales, la parasitosis se adaptó al ser humano. En la actualidad afecta particularmente a individuos que habitan viviendas inadecuadas en zonas rurales y suburbanas de Latinoamérica. Es una parasitosis ligada a la pobreza. A partir de 1970, un grupo de estudio auspiciado por la Organización Panamericana de la Salud, se percató de sus profundas implicaciones socioeconómicas y decidió declararla enfermedad social. (44)

El padecimiento pasa por tres etapas:

a) Fase aguda: Existe un periodo de incubación que generalmente es asintomático y oscila entre 4 a 10 días. Los síntomas se inician por la frecuente fiebre elevada e intermitente, por miocarditis y más comúnmente por un signo de puerta de entrada, el chagoma de inoculación y por la hepatoesplenomegalia y el crecimiento de ganglios linfáticos.

b) Fase indeterminada o de latencia: Suele durar de 10 a 20 años, es donde la enfermedad aparenta haber desaparecido espontáneamente, para instalarse posteriormente en el 30-40 % de los casos en la fase crónica.

c) Fase crónica: Se caracteriza por miocarditis, insuficiencia cardíaca progresiva, megas viscerales y muerte súbita. (44)

2.2 AGENTE ETIOLOGICO

2.2.1 Características

T. cruzi presenta en preparaciones teñidas, a partir de frotis sanguíneos, una morfología característica, ya que adopta forma de "c" o de "u". Tiene una longitud aproximada de 20 micras, un cinetoplasto muy grande, de posición subterminal. Posee además, un flagelo libre y membrana ondulante estrecha. Esta forma corresponde a la de tripomastigote, ya que el parásito presenta, dependiendo del huésped en que se encuentre, diferentes fases de desarrollo morfológicamente distintas y definidas por:

- 1) La forma general de la célula,
- 2) La posición del cinetoplasto (organelo que caracteriza el orden) con respecto al núcleo, y
- 3) La región en donde emerge el flagelo a partir de la bolsa flagelar. (12, 19)

Las fases son:

a) Amastigote: son de forma esférica u ovalada de aproximadamente 2 micras de diámetro, presentan cinetoplasto, gránulo basal, flagelo reducido a una corta porción del axonema que tiene un recorrido intraprotoplásmico sin atravesar la membrana; representa una forma de multiplicación que se encuentra intracelularmente en los mamíferos huéspedes.

b) Epimastigote: tienen el cinetoplasto situado en posición anterior cercana al núcleo, un flagelo y una membrana ondulante corta; son organismos fusiformes de aproximadamente 20 micras de longitud. Representan una forma de multiplicación que se encuentra en el tubo digestivo del transmisor y medio de cultivo.

c) Tripomastigote: existen dos tipos dependiendo del huésped en que se localicen:

c.1.- Tripomastigote metacíclico: tienen el cinetoplasto situado detrás del núcleo y un flagelo, así como una membrana ondulante a lo largo del organismo; su longitud aproximada es de 16 a 20 micras. Representan la forma infectiva. Se encuentran en el intestino posterior de los triatomos.

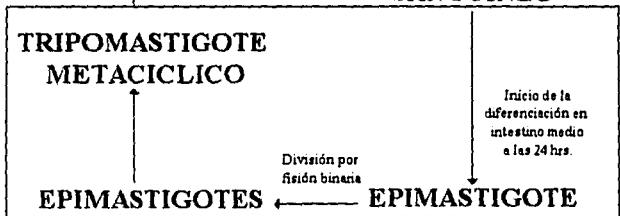
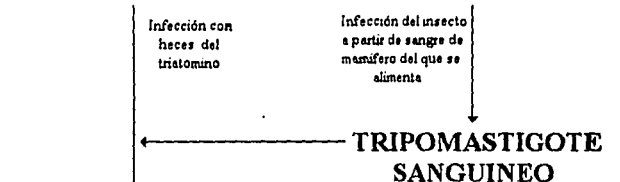
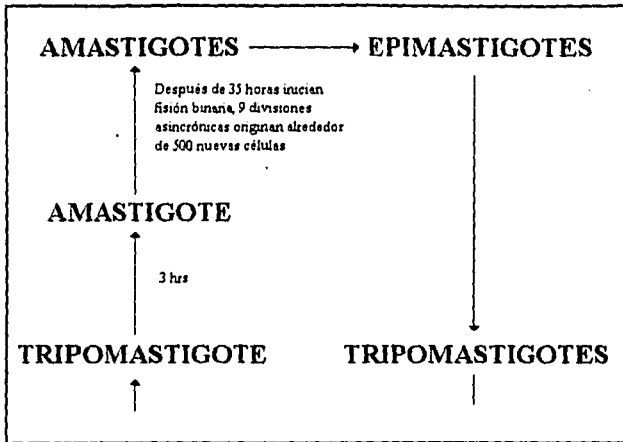
c.2.- Tripomastigote sanguíneo: morfológicamente presenta un cinetoplasto grande, oviforme, generalmente subterminal; núcleo central y una longitud de 16 a 20 micras. Se encuentran en el mamífero huésped donde transmiten la infección de una célula a otra, o infectan al triatomo cuando estos ingieren la sangre de individuos o animales infectados. (15)

2.2.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* involucra tanto a un mamífero como a un insecto transmisor (triatomino). Bajo condiciones naturales, la infección por *T. cruzi* es iniciada por los tripomastigotes metacíclicos, que se encuentran en el tubo intestinal del triatomo. El insecto al picar y succionar sangre del hombre o de otros mamíferos defeca, saliendo así los tripomastigotes metacíclicos, los cuales penetran a través de mucosas o de la conjuntiva ocular. Existen especies de triatomos que defecan en lapsos cortos, por lo que pueden originar la transmisión con mayor probabilidad.

El parásito, una vez que logra sobrevivir a la fagocitosis de los macrófagos al escapar de la vacuola fagocítica antes de la fusión de los lisosomas, se encuentra dentro de la célula y se transforma en

CELULA DEL MAMIFERO



INTESTINO DEL TRANSMISOR

Figura 1

Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

amastigote el cual inicia su reproducción, dividiéndose repetidamente por fisión binaria y destruyendo finalmente la célula huésped. Este ciclo reproductivo se repite varias veces y puede llevarse a cabo en cualquier tejido, aunque se ha reportado que los sitios más frecuentemente afectados son: miocardio, sistema nervioso central, sistema reticular endotelial y músculo liso del tracto intestinal. En estas localizaciones, los amastigotes suelen agruparse formando "nidos" después de haber destruido varias células huésped.

Después de algún tiempo, los amastigotes se transforman dentro de los nidos o pseudoquistes en tripomastigotes sanguíneos, los cuales son liberados alrededor del tejido. Estas fases suelen invadir células en el área inmediata, o ser acarreados a otros tejidos por medio de la circulación sanguínea.

Al estar circulando en sangre pueden ser ingeridos por el transmisor al alimentarse, y ya en su intestino se transforman en epimastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria transformándose después en tripomastigotes metacíclicos, complementándose así el ciclo de vida. (6) (Figura 1)

Otros artrópodos pueden mantener temporalmente la infección con *T. cruzi* y actúan como acarreadores del parásito por un corto tiempo, pero se considera sólo a los triatominos como único grupo con importancia epidemiológica.

2.2.3 Metabolismo

Debido a que *T. cruzi* no puede sintetizar y almacenar polisacáridos, tiene que incorporar continuamente los carbohidratos para así poder utilizarlos.

Mientras este presente la glucosa, los aminoácidos y las proteínas son comunmente la reserva energética, los cuales son utilizados como fuente de energía solo durante la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes. (31).

En los epimastigotes, los aminoácidos y la glucosa son transportados activamente, mientras que las proteínas se incorporan por pinocitosis a nivel de la bolsa flagelar. (7, 15)

Catabolismo de carbohidratos.

Se han encontrado dos diferencias entre la glicólisis de *T. cruzi* y la realizada por los mamíferos. Estas diferencias son:

1) El glicosoma, vesícula de una sola membrana con una longitud de 0.2 a 0.8 μm y que se observa con un aspecto globoso en las preparaciones al microscopio electrónico, es la que contiene a las primeras ocho enzimas glicolíticas: hexocinasa, fosfohexosa isomerasa, fosfofructocinasa, aldolasa, triosafosfato isomerasa; gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; fosfogliceratocinasa y fosfogliceratomutasa.

2) La hexocinasa y la fosfofructocinasa, enzimas claves en la regulación de la mayoría de los sistemas glicolíticos desde bacterias hasta mamíferos, en *T. cruzi* no son afectadas por los efectores más comunes. (40) La única regulación importante encontrada es a nivel de la piruvatoquinasa, la cual es fuertemente activada por muy bajas concentraciones de fructuosa-2,6-difosfato la cual es capaz, aun en concentraciones micromolares, de contrarrestar el efecto inhibitorio de ATP y Pi.

Como resultado de la carencia de controles inhibitorios de la glicólisis, la operación de esta vía no es influida directa o indirectamente por el oxígeno, con lo que el efecto Pasteur no se observa. (9)

En 1979, Von Brand estableció que los aminoácidos y carbohidratos son incorporados y consumidos por los epimastigotes, que a su vez excretan catabolitos parcialmente reducidos de la glucosa, principalmente succinato y amoníaco. (41)

Aunque no se conoce con certeza los nutrientes más importantes del protozoario, se sabe que:

1) Los epimastigotes aun estando en el intestino del insecto, donde los aminoácidos son abundantes y la glucosa escasa, son capaces de consumir ambos nutrientes, siendo la glucosa la primera en consumirse. (8)

2) Dependiendo de la fase en que se encuentre el parásito será el tipo de nutriente que prefiera, así se tendrá que:

a) Los amastigotes de los medios de cultivo son únicamente glucolíticos,

b) Los epimastigotes en la fase logarítmica emplean glucosa y en la fase estacionaria utilizan los aminoácidos; ambos obtenidos de medios de cultivo, y

c) Los tripomastigotes metacíclicos, que son estrictamente oxidativos, emplean los aminoácidos y las proteínas. (42)

Productos finales del metabolismo de la glucosa.

La glicólisis juega un papel muy importante en el aporte energético para el parásito, ya que a pesar de que se ha informado la presencia de todas las enzimas del Ciclo de Krebs, éste sólo es utilizado parcialmente y además, en sentido inverso.

Aun en condiciones aeróbicas, la glucosa es catabolizada parcialmente a CO_2 . La fijación de CO_2 por la fosfoenolpiruvato carboxilasa produce ácido oxalacético, que es reducido a ácido málico (en los glicosomas). El malato sale al citosol y penetra a la mitocondria para transformarse en fumarato y finalmente succinato.

El principal producto final del metabolismo energético de *T. cruzi* es el succinato, seguido de la alanina y el acetato en poca cantidad, al igual que el malato, lactato y piruvato. (10) (Figura 2)

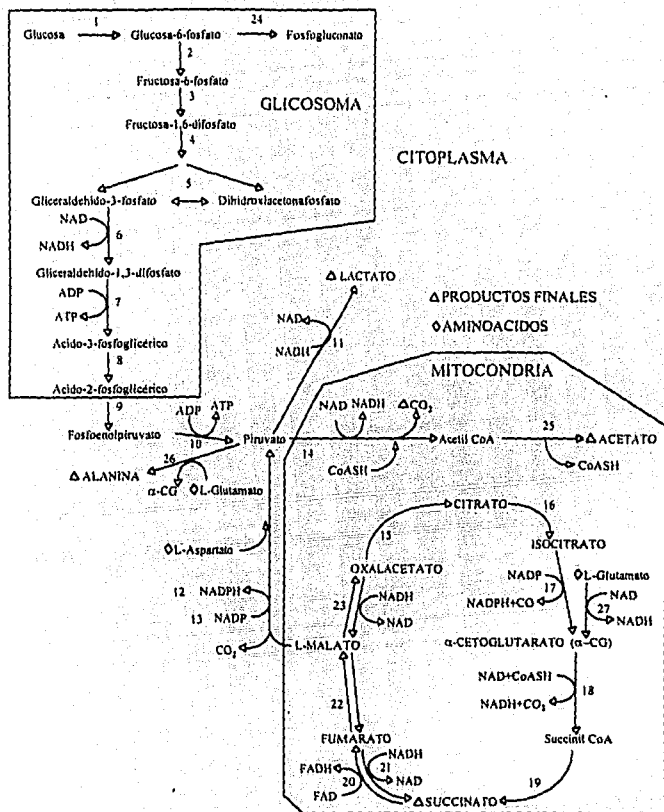


Figura 2
Metabolismo de *Trypanosoma cruzi*

Leyenda de Figura 2 Metabolismo de *Trypanosoma cruzi*

- 1 Hexocinasa
- 2 Fosfohexosa isomerasa
- 3 Fosfofructocinasa
- 4 Aldolasa
- 5 Triosafofato isomerasa
- 6 Gliceraldehido - 3 -fosfato deshidrogenasa
- 7 Fosfogliceratocinasa
- 8 Fosfogliceratomutasa
- 9 Enolasa
- 10 Piruvatocinasa
- 11 α - hidroxilácido deshidrogenasa
- 12 Fosfoenolpiruvato carboxicinasa
- 13 Enzima málica
- 14 Piruvato deshidrogenasa
- 15 Citrato sintasa
- 16 Aconitasa
- 17 Isocitrato deshidrogenasa
- 18 α - cetoglutarato deshidrogenasa
- 19 Succinato tiocinasa
- 20 Succinato deshidrogenasa
- 21 Fumarato reductasa
- 22 Fumarasa
- 23 Malato deshidrogenasa
- 24 Glucosa - 6 - fosfato deshidrogenasa
- 25 Acetil CoA hidrolasa
- 26 Alanina aminotransferasa
- 27 NAD - Glutamato deshidrogenasa

2.2.4 Sistema de reoxidación del NADH glicolítico

Para que los sistemas glicolíticos permanezcan funcionales, deben de contar con un eficiente sistema de reoxidación del NADH generado en la reacción de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Para poder reoxidar al NADH, *T. cruzi* tiene diferentes posibilidades, las cuales bajo condiciones aeróbicas todas son funcionales, y estas son: a) cadena respiratoria, b) producción de succinato y probablemente alanina y c) producción de lactato. (10) La producción de lactato es a través de la actividad de deshidrogenasa láctica, medida por una enzima propia de *T. cruzi* denominada α -hidroxiácido deshidrogenasa. (32)

2.3 AISLAMIENTO DE LAS FASES EXTRACELULARES

Al estudiar las distintas fases del ciclo de vida de *T. cruzi* se observa que las fases extracelulares pueden ser morfológicamente semejantes, por ejemplo, los tripomastigotes se encuentran en sangre (sanguíneos), transmisores y medios de cultivo (metacíclicos), en cambio los tripomastigotes metacíclicos, se sabe que son diferentes fisiológicamente, de los sanguíneos. (6) Basándose en dichas diferencias, la susceptibilidad a los fármacos se puede relacionar con la fase que se evalúa. Por lo que se sugiere someter a pruebas de inhibición a cada una de las fases por separado, de tal forma que es necesario la obtención y aislamiento de las fases extracelulares del parásito.

Diversos autores se han encaminado a separar éstas fases y han diseñado diferentes métodos, como:

2.3.1 Separación por centrifugación diferencial

Este método es propuesto por Yaeger (1955-1960), Gutteridge, Knowler y Coombes (1969), Kloetzel, Camargo y Giovannini (1975), con el cual aislan tripomastigotes de la mayoría de eritrocitos pero no de los leucocitos y plaquetas. Williamson y Cover (1966), emplean sacarosa para determinar gradientes de densidad. Budzko y Kierszenbaum (1974), crean un gradiente de densidad

con solución de Ficoll-hypaque. Sanderson, Thomas y Towmey (1980), utilizan dextrana (grupo de polisacáridos generalmente de origen bacteriano, obtenido por polimerización e isomaltosa, base para geles), para crear el gradiente de densidad. Loures, Pimenta y Souza (1980), aprovechan las propiedades de la metrizamida (alta solubilidad y neutralidad), para la separación. (20, 30)

2.3.2 Separación a través de cargas eléctricas

Martínez Palomo y De Souza (1976-1978). usando hidróxido de hierro coloidal y partículas férricas catiónizadas demuestran que *T. cruzi* posee sitios aniónicos en su superficie celular. Con el hierro coloidal, la incubación es llevada a cabo a pH 1.8, lo que facilita la detección de ácido siálico. La atadura de las partículas de hierro coloidal a la superficie celular de *T. cruzi* puede ser casi siempre completamente bloqueada por un tratamiento previo de las células con neuraminidasa (observaciones publicadas por Souto - Padrón y De Souza). (45)

Los datos bioquímicos indican que hay una buena aglutinación de *T. cruzi* con la lecitina obtenida a partir de *Limulus polyphemus* y del germen de trigo, lo cual confirma la presencia de ácido siálico en la superficie celular de *T. cruzi*.

Los hallazgos de los autores mencionados indican que la intensidad de la reacción, reflejada por el número de partículas ligadas a la superficie celular, es más alta en tripomastigotes obtenidos de sangre que en los tripomastigotes obtenidos a partir de cultivos acelulares y que en epimastigotes, tomando en cuenta que componentes celulares o componentes del suero de los huéspedes pudieran influir en el gran número de partículas de hierro coloidal presentes en la superficie celular de epimastigotes y tripomatigotes de *T. cruzi*.

Para probar lo anterior, los autores incuban al protozooario con fierro catiónico en condiciones fisiológicas, pH 7.2. Con esto observan que la fijación de partículas positivas es más intensa en los tripomastigotes sanguíneos que en epimastigotes, por eso proponen que la superficie celular de las

primeras formas tuvo más cargas negativas que la segunda. Los estudios de la carga neta de la superficie por movilidad electroforética (EPM) de epimastigotes y tripomastigotes indican que todas las formas tienen cargas negativas en su superficie, las cuales varían progresivamente de acuerdo a la etapa de desarrollo. Fundamentalmente, en la determinación de la EPM de mezclas, conteniendo epimastigotes y tripomastigotes a partir de cultivos axénicos observan que durante el desarrollo de *T. cruzi* hay un incremento gradual en la superficie neta, así que hay diferencias muy grandes con los tripomastigotes que tienen valores más altos. (15)

Dadas las diferencias en las cargas netas de cada una de las fases se aprovechará esta característica para separarlas a través de una columna de intercambio iónico (DEAE-celulosa) utilizando las experiencias de otros investigadores que se citan en la literatura. (11, 22, 23)

2.3.3 Separación a través de intercambiadores iónicos

El primer trabajo en utilizar DEAE-celulosa para obtener preparaciones puras de tripanosomátidos es realizado por Lanham (1968); en este trabajo no se logra separar tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* de eritrocitos, pero sí en el caso de: *T. brucei brucei*; *T. b. gambiense*; *T. evansi*; *T. simiae*; *T. congolense*; *T. vivax*. (23)

Posteriormente María Auxiliadora de Souza en 1983, en Río de Janeiro; basándose en los métodos de Lanham y Godfrey, lleva a cabo la separación de tripanosomátidos en columna por intercambiadores celulósicos, a partir de sangre infectada.

Encuentra que tiene algunas ventajas sobre otras técnicas de separación (centrifugación diferencial y gradientes de sacarosa); como son: ser más rápida, sencilla, económica y muy efectiva para la separación de las fases de tripomastigote y epimastigote provenientes de distintas fuentes o muestras. (38)

2.4 INHIBICION DE LA ENZIMA α -HIDROXIACIDO DESHIDROGENASA

El gossipol es un componente polifenólico amarillo, aislado especialmente en las semillas de la planta del algodón, presentando la siguiente fórmula química:

2,2'-bis(8-formil-1, 6,7-trihidroxi-5-isopropil-3-metilnaftaleno). (33) (Figura 3)

Estudios iniciales en China demostraron que su administración oral ocasiona oligospermia y azoospermia en humanos y otras especies, induciendo infertilidad; por lo que ahora está siendo utilizado como anticonceptivo masculino. Su eficiencia como agente anticonceptivo en humanos depende de los efectos deletéreos que produce en epitelios seminíferos, aunque también se ha demostrado que puede atravesar la barrera sanguínea testicular, lo cual indica que la droga penetra membranas celulares y otras barreras permeables.

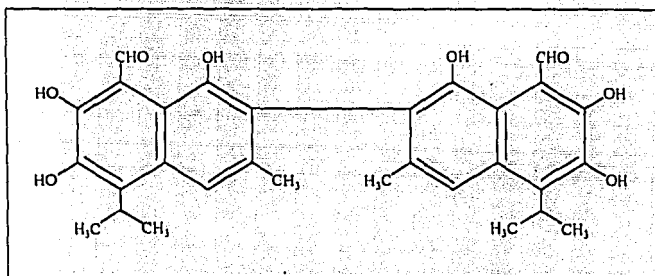


Figura 3

Estructura química de la molécula del Gossipol

Los estudios clínicos disponibles sugieren que el compuesto es bien tolerado por humanos en dosis controladas y que la espermatogénesis es completamente restablecida cuando el tratamiento es interrumpido.

Lee y Malling en 1981, sugirieron que el gopisol es un potente inhibidor selectivo de la isoenzima LDHx o C₄, la cual juega un papel importante en el metabolismo del esperma, participando en las vías que proveen la energía para la movilidad y supervivencia de las células gametogénica y espermatogénicas. (24)

En 1986 Morris, Higgins y Matling demostraron que el gopisol produce una inhibición dependiente de la concentración sobre la LDH testicular de los animales de laboratorio y del hombre.

Estudios de otros laboratorios indicaron que la acción del gopisol en la LDHx no es tan selectiva como fué propuesta, desde luego la enzima es inhibida fuertemente así como otras oxido-reductasas dependientes de NAD en los humanos. (3)

Por consiguiente se investigó su efecto sobre enzimas de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. La enzima α -hidroxiácido deshidrogenasa presenta una especificidad al sustrato semejante al que presenta la LDHx esperma específica y está implicada probablemente como la LDHx, en la generación de energía para la movilidad flagelar. (16)

Se estudiaron los efectos del gopisol en las oxidoreductasas de *T. cruzi* variando las concentraciones del compuesto y los tiempos de incubación, demostrándose que el gopisol es un potente inhibidor de las enzimas α -hidroxiácido y malato deshidrogenasa dependiente de NAD. Las enzimas glutamato, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la málica, las cuales utilizan NADP como coenzima, fueron también inhibidas aunque en menor grado. El gopisol no afectó la actividad de la succinato deshidrogenasa.

Los mecanismos de inhibición fueron también analizados, los cuales resultaron ser no competitivos con respecto al sustrato e incompetitivos con respecto a la coenzima. Anteriormente, Montamat, Burgos, Rovai y Blanco, habían reportado que la exposición al gopisol provoca inmovilización de epimastigotes y una reducción del crecimiento en los cultivos. (26)

Probablemente el bloqueo de las ruta metabólicas comprendidas en las oxidoreductasas unidas al NAD y al NADP pueden explicar tales efectos. Estudios posteriores condujeron a probar la acción *in vitro* del gospol dentro de los epimastigotes y tripomastigotes del parásito.

La incubación directa con gospol redujo la movilidad y produjo marcado daño estructural. Dentro de los cambios estructurales con altas dosis probadas se provocaba rompimiento del parásito; usando bajas dosis y tiempos cortos de incubación los cambios más rápidos se observaban en el cinetoplasto y mitocondria. (3)

Efectos análogos son inducidos por la droga en espermatozoides, las células del esperma son también paralizadas por el gospol, aunque las concentraciones son más altas que aquellas que inmovilizan a los epimastigotes. La cubierta mitocondrial en la pieza media del gameto masculino es la estructura más intensamente afectada. Al igual que en el parásito el mitocondrion es el organelo más rápidamente dañado. Las enzimas homólogas en los mamíferos, la LDHx y la malato deshidrogenasa, también son inhibidas por el gospol. Estas enzimas están localizadas en el citosol y la mitocondria e integradas en un sistema de lanzadera que transfieren equivalentes reducidos del citosol a la mitocondria.(4)

El gospol también ha sido probado en *Entamoeba histolytica*, observándose una inhibición en las enzimas málica deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa. (17)

Lee *et al* en 1982 demostraron que el grado de inactivación enzimática o inhibición depende del tiempo, concentración del gospol y de enzima, así como del orden de adición de los componentes ensayados. Si la enzima era primeramente mezclada con el gospol, un alto grado de inactividad e inhibición de la actividad enzimática fue observada.(25)

A pesar que la concentración del gosipol está siempre en exceso comparada con la de la enzima, se sugiere que la presencia de un componente menor en el gosipol responsable de la inactividad de esta en solución acuosa. Este componente menor puede ser:

- a) Impurezas contenidas en la muestra original del gosipol
- b) Descomposición de productos o formas tautoméricas

En vista de que el gosipol es un componente polifenólico se debe esperar un alto grado de inestabilidad de este componente en soluciones acuosas.

En base a los estudios realizados del gosipol sobre su actividad contra *T. cruzi*, en este trabajo se ha propuesto estudiar la actividad del 4-isopropil salicil aldehído (compuesto análogo al gosipol) sobre dicho parásito. (Figura 4)

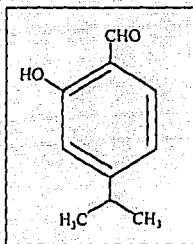


Figura 4

Estructura química de la molécula de 4-Isopropil salicil aldehído

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 Material biológico

+*Trypanosoma cruzi* clona CID-1, aislada de un caso humano por xenodiagnóstico, y mantenida desde 1982 en el laboratorio por pase ratón-triatomino-ratón.

+Sangre de conejo desfibrinada

+Sangre de carnero (vial)

3.2.2. Material de laboratorio

+Agitador

+Asa bacteriológica

+Balanza analítica

+Balanza granataria

+Celdas espectrofotométricas

+Espátula

+Guantes y cubre bocas

+Jeringas de 3, 5 y 20 ml

+Matraces erlenmeyer de 150, 250 y 500 ml

+Mechero Bunsen

+Micropipetas de 50, 100 y 1 000 μ l

+Pipetas Pasteur

+Pipetas de 0.1, 1, 5 y 10 ml

+Porta y cubreobjetos

+Probetas de 100 y 500 ml

+Tela de organza

+Tubos de ensayo de 13 X 100

- +Tubos eppendorf de 1.5 ml
- +Tubos para centrifuga con tapón
- +Vasos de precipitado de 100 y 250 ml

3.2.3 Reactivos

- +Acido caproico (Sigma Chemical Co)
- +Acido clorhídrico (J. T. Baker)
- +Base de agar sangre (Dibico)
- +Cloruro de sodio (Productos Químicos Monterrey)
- +DEAE-celulosa (Sigma Chemical Co)
- +Dextrosa (Productos Químicos Monterrey)
- +Ditiotreitol
- +EDTA (Merck)
- +Etanol (Merck)
- +Fenol (J.T. Baker)
- +Fosfato dibásico de sodio (Técnica Química)
- +Fosfato monobásico de sodio (J. T. Baker)
- +Gossypol acetic acid (Sigma Chemical Co)
- +Hidróxido de sodio (J. T. Baker)
- +Infusión cerebro corazón (Bioxon)
- +4-Isopropil salicil aldehido (4-ISA)
- +NADH (Sigma Chemical Co)
- +Nitrógeno líquido
- +Penicilina g cristalina
- +Piruvato de sodio (Sigma Chemical Co)
- +Sulfato de estreptomycinina

3.2.4 Equipo

- +Autoclave Industrias Steele Presto Modelo 21L
- +Centrífuga Jovan-Paris modelo k-63F
- +Centrífuga Hettich Universal II
- +Espectrofotómetro UV/visible Jasco, modelo 7800
- +Incubadora Preciso Gravity Convention Incubator G.C.A. Corporation.
- +Microcentrífuga eppendorf modelo 5415C
- +Microscopio binocular Zeiss
- +Refrigerador Cabhers

3.2.5 Preparación de soluciones

+Cloruro de sodio al 0.85%.

Pesar 0.85 g de NaCl, disolver en 100 ml de agua destilada. Se esteriliza a 121°C o 15 libras de presión durante 15 minutos.

+Fenol al 5%

Pesar 100 g de fenol y disolver en 2 000 ml de agua destilada. Agitar y conservar en un frasco de color ambar.

+Solución amortiguadora de fosfatos 0.05M

K_2HPO_4 8.75 g

KH_2PO_4 1.125 g

Disolver las sales en 800 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 7.5 con NaOH o con HCl al 10% y una vez ajustado el pH, aforar a 1 000 ml en un matraz volumétrico.

Almacenar a 4°C hasta su uso.

+Solución amortiguadora de fosfatos salina glucosa

Na_2HPO_4 anhidro	13,48 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,78 g
NaCl	4,25 g

Disolver los reactivos en 800 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 8 y aforar a 1 000 ml.

Para obtener la fuerza iónica de 0,145 se debe de tomar 4 ml de la solución anterior y diluir en 6 ml de agua.

Almacenar a 4°C. Cuando se va a emplear la solución agregar 1 g de glucosa para obtener una solución al 10%

+Mezcla estabilizadora enzimática

Ditiotreitol	1,54 g
EDTA	2,52 g
Acido caproico	2,52 g

Disolver los reactivos en 50 ml de amortiguador de fosfatos 0,05M pH 8. Antes de emplearse, diluir la solución 1:10 con el amortiguador de fosfatos.

+Gosipol 0,1M

Pesar 0,0578 g de Gossypol acetic acid y disolver en 1 ml de etanol; guardar en un lugar oscuro hasta su empleo.

A partir de esta solución realizar las diluciones necesarias para obtener las concentraciones finales siguientes:

1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} y 1×10^{-7} M.

+4-Isopropil salicil aldehido (4-ISA) 0,1M

Pesar 0,0164 g de ISA y diluir en 1 ml de etanol. Almacenar en un lugar oscuro hasta su utilización.

A partir de esta solución realizar las diluciones necesarias para obtener las siguientes concentraciones 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} y 1×10^{-7} M.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

El medio con gelosa sangre se prepara como sigue:

Base agar sangre 4 g
Agua destilada 100 ml

Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos; enfriar a 48 a 50°C y agregar 20 ml de sangre desfibrinada de conejo o sangre de carnero. En seguida distribuir en matraces erlenmeyer de 250 ml, dejar solidificar. Incubar por 24 horas para prueba de esterilidad y después añadir 50 ml de solución salina estéril al 0.85% con infusión cerebro corazón (0.1 g en 100 ml de solución salina).

Para evitar contaminación de bacterias agregar Penicilina g cristalina y sulfato de estreptomycin. (14)

Realizar el pase de la cepa al medio de cultivo e incubar el tiempo necesario.

3.3.2 Aislamiento de tripomastigotes metacíclicos de medios de cultivo

a) Preparación de la columna de DEAE-celulosa

Verter la DEAE-celulosa (0.3 g por columna) sobre la superficie de 15 ml de NaOH 0.5 N en un vaso de precipitado, dejar que el polvo se hunda en el líquido. Dejar reposar el material y con ayuda de una pipeta Pasteur eliminar el líquido sobrenadante. Resuspender el sedimento en una solución de 15 ml de HCl 0.5 N. Dejar reposar 15 minutos y repetir el lavado con NaOH 0.5 N. Realizar lavados con agua destilada hasta que el líquido sobrenadante este transparente. Realizar un último lavado con 15 ml de solución EDTA 0.01 M por 15 minutos

Para empacar la columna colocar en el fondo de una jeringa desechable de 3 ml como filtro una malla de organza de un diámetro aproximado de 1 cm, lavar con amortiguador inicial (PS) y probar fluidez.

Resuspender la DEAE-celulosa en 20 ml de PS y verter a la columna, procurando tener un empacamiento uniforme. Lavar con PS hasta que el pH del eluido sea de 8.

b) Obtención de tripomastigotes metacíclicos

Tomar 1 ml del medio de cultivo (fase líquida) de 40 días de incubación y verter a la columna alrededor de la pared (con el fondo cerrado, es decir, flujo parado), dejar hundir la muestra lentamente en el adsorbente (si es necesario abrir el flujo) y cuando la última parte de la muestra penetra, lavar el adsorbente con PS dejando penetrar por completo cada lavado antes de realizar el siguiente. Adicionar gradualmente el amortiguador de fosfatos salino glucosado (PSG) con fuerza iónica (f. i.) 0.145 a través de la columna, manteniendo el flujo requerido (17 a 20 gotas por minuto), hasta sacar de la columna a los componentes que no se adsorben y a los que se adsorben muy lentamente. Recolectar en fracciones de 2 ml el líquido eluido hasta observar al microscopio que ya no eluyan los tripomastigotes metacíclicos. Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos y observar al microscopio. Resuspender con PSG f. i. 0.145 y reunir las fracciones.

3.3.3 Cosecha de *Trypanosoma cruzi*

La cosecha se realiza para la obtención de la enzima α -hidroxiácido deshidrogenasa.

Después de incubar aproximadamente 40 días los medios de cultivo revisar el crecimiento al microscopio. Si existe crecimiento, transferir la fase líquida a tubos de centrifuga con tapón. Centrifugar a 3000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. Decantar el sobrenadante en fenol al 5% , resuspender en solución salina estéril 0.85%. Pasar a tubos de 13 X 100 y centrifugar a

3500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Lavar hasta obtener un sobrenadante transparente, resuspender con solución salina estéril, reunir las fracciones en tubos eppendorf, centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos eliminando el sobrenadante. Resuspender con mezcla estabilizadora 20 mM, e introducir en nitrógeno líquido, calentar con la mano (efectuar estos pasos dos veces), centrifugar a 3500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, transpasar el sobrenadante a otro vial y conservar en nitrógeno líquido o bien a temperatura de -20°C.

3.3.4 Determinación de la actividad enzimática de la α - hidroxilácido deshidrogenasa

Para determinar la actividad de la α -hidroxilácido deshidrogenasa se sigue el método descrito por Bermeyer (2)

En una celdilla colocar 2.75 ml de solución reguladora de fosfatos 0.5 M, pH 7.2; 0.10 ml de piruvato de sodio de concentración de 1.55×10^{-4} M; 0.05 ml de NADH. Agitar y agregar 0.10 ml de la enzima. Ajustar el espectrofotómetro a 340 nm y 0.000 de absorbancia y seguir el curso de la reacción durante 5 minutos haciendo lecturas cada minuto.

El promedio de las diferencias de estas lecturas dará el cambio de absorbancia por minuto y de esta manera se obtendrá la actividad total de la enzima.

3.3.5 Determinación del efecto inhibitor del gospol y 4-ISA sobre la actividad de la α -hidroxilácido deshidrogenasa

Determinar la actividad de la α -hidroxilácido deshidrogenasa en presencia del inhibidor, colocando las mismas cantidades de reactivos, con la única diferencia que el inhibidor se disuelve en etanol para realizar la prueba con diferentes concentraciones y volúmenes.

3.3.6 Determinación de la susceptibilidad de las fases de epimastigote y tripomastigote metacíclico al gosiol y 4-ISA.

Se emplea la técnica propuesta por Montamat y Blanco (26), la cual utiliza la fase líquida del medio de cultivo en la que ha crecido el parásito de 7 a 15 días, lo que asegura que se trabajará con epimastigotes.

Colocar 0,5 ml de esta solución en tubos eppendorf de 1,5 ml de capacidad. En seguida agregar 3 microlitros de los compuestos a evaluar disueltos previamente en etanol.

Después de transcurrir el tiempo establecido para cada lectura, tomar una muestra con el asa bacteriológica y depositar entre un porta y cubreobjetos.

Contar 10 campos microscópicos utilizando el objetivo de 40X y reportar el número de formas móviles, que se consideran vivos (las formas inmóviles se consideran muertas).

Para la evaluación en la fase de tripomastigote metacíclico sustituir la fase líquida del medio por el eluido obtenido de las columnas de DEAE - celulosa.

En ambos casos emplear un blanco de etanol.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS

Los valores que a continuación se presentan se obtuvieron al realizar la determinación de la actividad tripanomicida y el efecto inhibidor de los fármacos gosipol y 4-Isopropil salicil aldehido (4-ISA) sobre la clona CID-1 de *Trypanosoma cruzi*.

La determinación del efecto inhibidor se realizó sobre la enzima α -hidroxiácido deshidrogenasa, la cual se encuentra presente en el metabolismo del parásito, y según informes de la literatura, es inhibida por el gosipol. (32)

La enzima se obtuvo dentro de un extracto crudo, al someter a *T. cruzi* a cambios bruscos de temperatura, provocando su lisis celular.

En la tabla I se presenta el efecto inhibidor del gosipol y 4-ISA sobre la enzima, utilizando diferentes concentraciones. La medición de la actividad enzimática se realizó en un tiempo de 15 minutos.

Los valores de esta tabla se encuentran representados en la gráfica I.

Tabla I

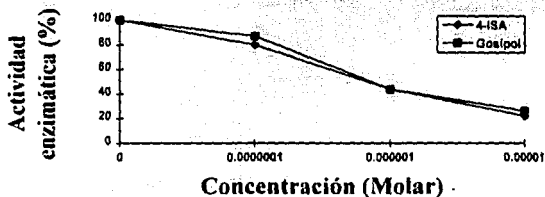
Evaluación del 4-ISA y el gosipol en la actividad enzimática de la α -hidroxiácido deshidrogenasa de *T. cruzi*, por el método de Bermeyer. (2)

Concentración (Molar)	4-ISA*	Gosipol*
0.0	100	100
0.00001	22	26
0.000001	44	44
0.0000001	80	87

* La actividad enzimática está expresada en porcentaje

Gráfica I

Efecto inhibitor del gosipol y 4-ISA sobre la enzima α -hidroxiácido deshidrogenasa de *T. cruzi*.



Una vez comprobado que el gopipol y 4-ISA actúan sobre la enzima α -hidroxiácido deshidrogenasa, se procedió a evaluar la actividad tripanomicida en las fases extracelulares de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos, los cuales están presentes en medios de cultivo difásicos.

Para epimastigotes se emplearon medios con 7 días de incubación, mientras que para tripomastigotes metacíclicos el periodo de incubación fue mayor; es decir, 40 días.

En la tabla II se presenta la acción del gopipol sobre epimastigotes en concentraciones de 0.000001M hasta 0.1M, con lecturas realizadas en intervalos de 30 minutos, hasta llegar a los 150 minutos (1.5 hrs).

En la tabla III se presenta la acción del 4-ISA sobre epimastigotes, en concentraciones de 0.000001M hasta 0.001M, con lecturas realizadas en intervalos de 30 minutos hasta un tiempo final de 150 minutos.

En la gráfica II se muestra comparativamente, el seguimiento de la actividad tripanomicida de ambos fármacos durante 150 minutos, a una concentración de 0.001M, mientras que en la gráfica III se varía la concentración a 0.000001M.

En la gráfica IV se comparan las actividades tripanomicidas de los fármacos al término de la prueba; es decir, a los 150 minutos, utilizando diferentes concentraciones.

Los tripomastigotes metacíclicos se aislaron por cromatografía de intercambio iónico a partir de la fase líquida de los medios difásicos.

Durante la evaluación de la actividad de los fármacos sobre esta fase se presentó un comportamiento idéntico al que tuvieron los epimastigotes.

Tabla II

Evaluación del gopipol sobre epimastigotes de la clona CID-1 de *T. cruzi*, por el método de Bianco.
(26)

<i>Concentración</i> (Molar)	<i>Tiempo (minutos)</i>					
	<i>0</i>	<i>30</i>	<i>60</i>	<i>90</i>	<i>120</i>	<i>150</i>
<i>0.1</i>	100	30	20	20	20	0
<i>0.01</i>	100	40	30	30	25	20
<i>0.001</i>	100	55	50	50	40	20
<i>0.0001</i>	100	65	60	50	30	30
<i>0.00001</i>	100	80	70	70	70	30
<i>0.000001</i>	100	90	85	85	85	70
<i>Testigo</i>	100	100	100	100	100	100

*La sobrevivencia está expresada en porcentaje

Tabla III

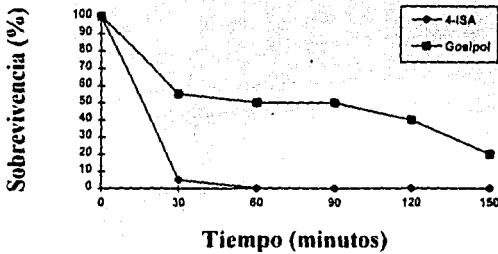
Evaluación del 4-ISA sobre epimatigotes de la clona CID-1 de *T. cruzi*, por el método de Blanco.
(26)

Concentración (Molar)	Tiempo (minutos)					
	<i>0</i>	<i>30</i>	<i>60</i>	<i>90</i>	<i>120</i>	<i>150</i>
<i>0.001</i>	100	5	0	0	0	0
<i>0.0001</i>	100	20	5	0	0	0
<i>0.00001</i>	100	40	36	30	30	30
<i>0.000001</i>	100	50	50	50	50	50
<i>0.0000001</i>	100	90	80	80	80	80
Testigo	100	100	100	100	100	100

*La sobrevivencia está expresada en porcentaje

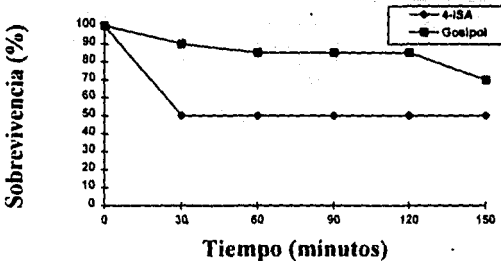
Gráfica II

Comparación de la actividad tripanomicida del gosalpol y su análogo 4-ISA sobre epimastigotes de la clona CID-1 de *T. cruzi*, a una concentración de 0.001M (1mM).



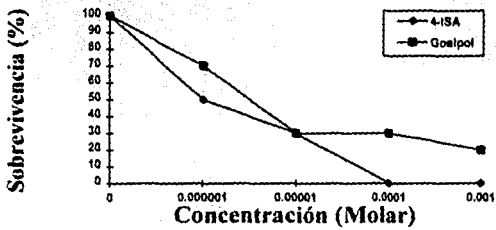
Gráfica III

Comparación de la actividad tripanomicida del gosalpol y su análogo 4-ISA sobre epimastigotes de la clona CID-1 de *T. cruzi*, a una concentración de 0.000001M (1µM).



Gráfica IV

Comparación de la actividad tripanomicida del gosalpol y 4-ISA sobre epimastigotes de la clona CID-1 de *T. cruzi* en un tiempo final de 150 minutos.



4.2 DISCUSION.

Después del descubrimiento de la enfermedad de Chagas en 1909, y hasta 1937 no había sido probado en humanos ningún compuesto químico contra esta enfermedad. A partir de este año se inició la búsqueda de fármacos con actividad contra *T. cruzi* por diversas industrias farmacéuticas.

Sin embargo, la quimioterapia de esta enfermedad es aún inadecuada, ya que las drogas de elección son parcialmente efectivas en el tratamiento de la fase crónica de la enfermedad, presentan efectos colaterales y se han descrito cepas del parásito resistentes a éstas; por lo que se duda que sean capaces de realizar una cura parasitológica. (28)

Por lo tanto, son importantes las investigaciones para el desarrollo de nuevos compuestos, basándose en estudios sobre la bioquímica y biología molecular de los tripanosomas para obtener diferencias marcadas entre el parásito y el hospedero que pudieran ser explotadas como blanco de estas drogas. (28)

En el presente trabajo se empleó como enzima blanco la α -hidroxiácido deshidrogenasa que posee *T. cruzi* y esta involucrada en el metabolismo energético del parásito. (26)

Debido a la similitud tanto estructural como funcional existente entre la enzima LDHx del espermatozoide y la α -hidroxiácido deshidrogenasa de *T. cruzi*, Blanco ha encontrado que los inhibidores selectivos de la LDHx, como es el gopisol, inhiben también a la α -hidroxiácido deshidrogenasa, actuando de manera semejante tanto en el espermatozoide como en el parásito al disminuir su motilidad y llegando a causar la muerte del parásito, tanto *in vivo* como *in vitro*. (13, 32)

Por lo anterior se pensó que la parte activa de la molécula del gopisol es el isopropil salicil aldehído, así que se llevó a cabo el estudio del comportamiento del 4-Isopropil salicil aldehído (4-ISA),

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

compuesto análogo del gopisol, que fue proporcionado por el Dr Carlos Wong Ramírez del Departamento de Bioquímica de la ENCB - IPN.

Para corroborar que el 4-ISA presenta una actividad tripanomicida semejante al gopisol, inicialmente se procedió a determinar el efecto inhibitor de ambos fármacos sobre la enzima α -hidroxiácido deshidrogenasa, teniéndose lo siguiente:

Tanto el gopisol como el 4-ISA actúan inhibiendo a la enzima del parásito.

La inhibición de la actividad enzimática es ligeramente menor en el gopisol con respecto al 4-ISA.

La actividad enzimática se ve disminuida conforme se aumenta la concentración de los fármacos, por lo que se puede decir que la actividad de la enzima es inversamente proporcional a la concentración del fármaco en estudio.

Viendo que el gopisol y el 4-ISA afectan a la enzima de *T. cruzi*, a continuación se realizó la evaluación de dichos fármacos sobre las fases extracelulares del parásito, resultando que:

Tanto gopisol como 4-ISA inhiben la motilidad y sobrevivencia de *T. cruzi* en diferentes proporciones.

El máximo porcentaje de sobrevivencia con el gopisol fue de 90% a una concentración de 0.000001M a los 30 minutos de haber puesto en contacto el parásito con el fármaco, mientras que a una concentración de 0.1M y en un tiempo de 150 minutos ya no se observaron parásitos vivos.

Con el 4-ISA se registró el máximo porcentaje de sobrevivencia en 90% con la concentración de 0.0000001M a los 30 minutos de iniciada la prueba, y una mortalidad del 100% en la concentración de 0.001M a los 60 minutos de estar en contacto el parásito con el fármaco.

Se observa que la sobrevivencia máxima en ambos fármacos fue del 90% en un tiempo de 30 minutos, dándose como variante la concentración, ya que para gosirol es mayor que para 4-ISA. En cuanto a la reducción de la población al 100%, ésta se registró en una concentración y tiempo menor para 4-ISA en comparación con el gosirol.

El 50% de sobrevivencia se registra para 4-ISA en la concentración de 0.000001M, mientras que para el gosirol es en la concentración de 0.001M, 1 000 veces mayor a la que registra 4-ISA.

Al comparar los valores obtenidos al finalizar la prueba, se tiene que:

La actividad del gosirol es menor que el 4-ISA, ya que se necesita mayor concentración de gosirol para inhibir la motilidad y disminuir la sobrevivencia de *T. cruzi* que el 4-ISA.

Para ambos fármacos se tiene que la reducción de la sobrevivencia depende directamente proporcional a la concentración de los fármacos y del tiempo.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- 1.- El fármaco 4-Isopropil salicil aldehído (4-ISA) ejerce un efecto inhibitor sobre la enzima α -hidroxiácido deshidrogenasa de *T. cruzi*, semejante a la que realiza el gopipol.
- 2.- Las fases de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos de la clona CID-1 de *T. cruzi* presentan un metabolismo similar en cuanto a la participación de la enzima α -hidroxiácido deshidrogenasa, ya que en ambas fases la motilidad y sobrevivencia se vió disminuida con los fármacos estudiados.
- 3.- El 4-ISA mostró mayor actividad biológica sobre las fases extracelulares de la clona CID-1 de *T. cruzi*, debido propablemente a que se incorpora más fácilmente al parásito.
- 4.- Por el comportamiento semejante que presentaron el 4-ISA y el gopipol sobre la enzima α -hidroxiácido deshidrogenasa y las fases extracelulares de la clona CID-1 de *T. cruzi*, se propone que la molécula isopropil salicil aldehído es la parte biológicamente activa del gopipol, por lo que estos resultados apoyan la hipótesis de trabajo.
- 5.- La importancia de la elaboración de nuevos fármacos contra *T. cruzi* radica en la efectividad y especificidad de las drogas, para que la probabilidad de una curación parasitológica sea cada vez mayor.

BIBLIOGRAFIA

1. Al Abbassy, S.N. "Isolation of trypomastigote from of *T. cruzi* from a mixture of the trypomastigote and epimastigote forms of the parasite by use of a DEAE -cellulose column". JOUR. PARASITOL., 58(3): 631-632, (1972).
2. Bergmeyer, U. H. METHODS OF ENZIMATIC ANALYSIS. Academic Press, N. Y. and London. p 736, 743, (1965).
3. Blanco A., A. Aoki, E. Montamat y L. E. Rovai. "Effect of gossypol upon motility and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*". J. PROTOZOOLOG 30: 648-651, (1983).
4. Burgos C., C. E. Coronel, N. M. Gerez de Burgos y A. Blanco. "Studies *in vitro* on shuttle system of mouse spermatozoa". BIOCHEM J. 208: 413-417. (1982).
5. Bulletin of the World Health Organization. "Enfermedad de Chagas". Informe de un grupo de estudio. SER. INF.TEC. No. 202 pp. 22, (1960).
6. Brener, Z. "Biology of *T. cruzi*". ANN. REV. MICROBIOL. 27:347-382. (1973).
7. Cazzulo J. J. "Protein and aminoacid metabolism in *Trypanosoma cruzi*" COMP. BIOCHEM. PHYSIOL. 79(B): 309-320,(1984).
8. Cazzulo J. J., et al. "End products and enzymes levels of aerobic glucose fermentation in Trypanosomatids". MOL. BIOCHEM. PARASITOL. 16: 329-343, (1985).
9. Cazzulo J. J., Aranza S., Frankie de Cazzulo B. M. and Cannata J. J. B. "On the production of glycerol and L-alanine during the aerobic fermentation of glucose by Tripanosomatids". FEMS MICROBIOL. LETT. 51: 187-192,(1988).
10. Cazzulo J. J. "Energy metabolism in *Trypanosoma cruzi* Avila and Harris , Subcellular Biochemistry: Intracellular Parasites, Plenum Press, Vol 18, pg 235 - 252, New York USA (1992)

11. Chao, D., D. Dusanic, "Comparative studies the isolation of metacyclic tripomastigotes of *T. cruzi* by DEAE - ion - exchangers". *Chung Hua Minkwo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Tsa Chih.* 17(3): 146-152, (1984).
12. Cheng, T.C. PARASITOLOGÍA GENERAL. Editorial AC., Libros Científicos y Técnicos. Madrid España, pp. 164-165 y 862-863, (1978).
13. Coronel C.; L. E. Rovai, N. M. Gerez de Burgos; C. Burgos y A. Blanco. "Propierties of alpha-hidroxyacid dehydrogenase isozymes from *Trypanosoma cruzi*". *MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY* 4: 28-29, (1981).
14. Cortes J., M.; "Aislamiento y estudio de un tripanosoma hallados en murciélagos mexicanos (Leptoncyteris: Phyllostomidae)". Tesis. ENCB - IPN. México, (1970).
15. De Souza W. "Cell biology of *T. cruzi*". *INT. REV. CYTOL.* 86: 197-283, (1984).
16. Gerez de Burgos N. M.; C. Burgos; E. E. Montamat; L. E. Rovai and A. Blanco. "Inhibition by gossypol of oxido reductase from *Trypanosoma cruzi*". *BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY* 33(7): 955-959, (1984).
17. González Garza M. T.; S. A. Matlin y B. D. Mata-Cardenas. "*Entamoeba histolytica*: Potent in vitro antiameobic effect of gossypol" *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY* 66: 253-255, (1988).
18. Gutteridge W. E. " *Trypanosoma cruzi*: recent biochemical advances". *TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE.* 75(4), (1981).
19. Hoare, A.C., F. Wallace, G. "Developmental stage of Trypanosomatid flagellates". *A NEW TERMINOLOGY.* *NATURE* 218: 1385-1386, (1966).
20. Kloetzel, J, M. E. Camargo y V. L. Giovannini. "Antigenic Differences Among Epimastigotes, Amastigotes and Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*". *J. PROTOZOOL.*, 22: 259-261, (1975).

21. Kunin, R. ION EXCHANGE RESINS. John Wiley & Sons. Sec. edition. Inc. London, pp. 340-343. (1958).
22. Lanham, S. M. "Separation of trypanosomas from blood of infected rats and mice by anion - exchanges". NATURE. 28: 1273-1274, (1968).
23. Lanham, S. M. y D. G. Godfrey. "Isolation of salivarian trypanosomas from man and other mammals using DEAE - cellulose". EXP. PARASITOLOGY. 28: 521-534, (1970).
24. Lee C. Y., y H. V. Mallig. "Selective inhibition of sperm specific lactate dehydrogenase x by an antifertility agent: Gossypol". FED. PROC. AM. SOCS. EXP. BIO. 40: 718. (1981).
25. Lee C. Y., Y. S. Moon, J. H. Yuan y A. F. Chen. "Enzyme inactivation and inhibition by gossypol". MOLEC. CELL 47: 65-70. (1982).
26. Montamat E. E.; C. Burgos; N. M. Gerez de Burgos; L. E. Roval; A. Blanco y L. E. Segura. "Inhibitory action of gossypol on enzymes and growth of *T. cruzi*". SCIENCE 218: 288-289, (1982).
27. Noguera T. B. "Susceptibilidad de cinco especies de triatominos (Hemiptera: Reduviidae) a la infección con *T. cruzi*". Tesis profesional. E.N.C.B. - I.P.N. México, (1985).
28. Noguera T. B.; I. Baeza R. y C. Wong R. "Orientación actual de la quimioterapia de la enfermedad de Chagas". ACTA MEDICA. 27(105-106): 37-56, (1991).
29. Peterson, A. INTERCAMBIADORES CELULOSICOS DE IONES. Técnicas de laboratorio en biología molecular y bioquímica. Edit. El Manual Moderno. México, D.F. (1975).
30. Purification of metacyclic forms of *T. cruzi* by Percoll discontinuous gradient centrifugation. Z. PARASITEND. 70(4). (1984).
31. Rodriguez F.; Ramirez J. L. and Rangel Aldao R. "Gene expression of tubulin during the differentiation of *T. cruzi*". Abstracts VIPAABS Congress, Sao Paulo, Brazil, p 70, (1990).

32. Rovai L. E.; A. Aoki; N. M. Gerez de Burgos y A. Blanco. "Effect of gossypol on trypomastigotes and amastigotes of *T. cruzi*". J. PROTOZOOL. 37(4): 280-286, (1990).
33. Royer R. E.; L. M. Deck; N. M. Campos; L. A. Hunsater and D. L. Vander jagt. "Biologically active derivates of gossypol: syntesis and antimalarial activities of Peri-acylated gossylic nitriles". J. MED. CHEM. 29(9): 1799-1801, (1986).
34. Sanderson, C. J., A. Thomas, J. y Towmey, C. E. "The growth of *Trypanosoma cruzi* in human diploid cells for the production of trypomastigotes". PARASITOLOGY, 80: 153-162, (1980).
35. Schenone, H., H. González. "Perspectivas sobre la Enfermedad de Chagas". BOL. CHILENO DE PARASITOL., 37: 1, (1982).
36. Souto - Padrón, T., E. Chiari. "The surface charge of Trypomastids of genus *Trypanosoma*". MEMB. INST. OSWALDO CRUZ 85 (2): 215-219. Citado por De Souza en 1977. (1990).
37. Souza, W., E. Chiari, Romanha, A. J. y Chiari, C. A. "Aglutination by concanavalin A of trypomastigotes and epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* separated on DEAE - cellulose column". Presented in the "III Reuniao Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas", pp. 12-13, Caxambu, MG, Brasil. (1976).
38. Souza, W., Arguello, C., A. Martínez - Palomo, D. Trissi, A. González - Robles, y E. Chiari. "Surface charge of *Trypanosoma cruzi*. Binding of Cationized Ferritin and Measurement of cellular electrophoretic Mobility". J. PROTOZZOL. 24: 411-415. (1977).
39. Tay, J. "La enfermedad de Chagas en la República Mexicana". SAL. PUB. MEXICO. 22(6): 409-450. (1980).
40. Taylor, M. B. and Gutteridge W. E. "The regulation of phosphofructokinase in epimastigote *T. cruzi*" FEBS LETT 201:262-266 (1990)
41. Urbina J. A. and Azavache, V. "Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes II NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase". MOL. BIOCHEM. PARASITOL 11: 241-253 (1984)

42. Urbina, J. A.; Osorno, C. E. and Rojas A. "The central role of phosphoenol pyruvate carboxikinase in the energy metabolism of *Trypanosoma cruzi* studies using 3-mercaptopicolinic acid". MEM. INST. OSWALDO CRUZ, 84: suppl. II:sg (1989)
43. Velasco, C. O., C. Guzmán, B. "Importancia de la Enfermedad de Chagas en México". REV. LAT - AMER. MICROB. 28: 275-283. (1986).
44. Velasco C.,O. "La enfermedad de Chagas". PUBLICACION TECNICA DEL INDRE No. 8. México D. F., (1991).
45. W. H. O. (World Health Organization. UNDP/World Bank/W. H. O. Special programme for Research and trainig in Tropical Disease). "Scientific nd technical Review Committee. Coupilado por Moncayo, A.". EN MEM. INST. OSWALDO CRUZ, 81(8): 179-183. (1986).