

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**ESTUDIO DEL EFECTO COMBINADO ENTRE  
PENTAMIDINA Y FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS EN  
UN MODELO *IN VIVO* DE INFECCIÓN AGUDA DE LA  
ENFERMEDAD DE CHAGAS**

**VERÓNICA ANDREA SEGUEL CARREÑO**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGISTER EN FARMACOLOGÍA**

**Director de Tesis: Prof. Dr. Rodrigo López Muñoz**

**2017**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**ESTUDIO DEL EFECTO COMBINADO ENTRE  
PENTAMIDINA Y FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS EN  
UN MODELO *IN VIVO* DE INFECCIÓN AGUDA DE LA  
ENFERMEDAD DE CHAGAS**

**VERÓNICA ANDREA SEGUEL CARREÑO**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGISTER EN FARMACOLOGÍA**

**Director de Tesis: Prof. Dr. Rodrigo López Muñoz**

**2017**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata**

**VERÓNICA ANDREA SEGUEL CARREÑO**

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Farmacología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 21 de Julio de 2017**

**Prof. Dr. Rodrigo López Muñoz**  
Director de Tesis  
Laboratorio de Bioquímica, Metabolismo y Resistencia a Fármacos  
Programa de Farmacología Molecular y Clínica  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

.....  
**Prof. Dra. Ulrike Kemmerling**

.....  
**Prof. Dra. Galia Ramírez**

.....  
**Prof. Dr. Juan Carlos Prieto**

.....  
**Prof. Dr. Jorge Ferreira**  
Presidente Comisión

***A Pablo,  
por todo tu apoyo  
y enseñarme a confiar en mí.***

## **AGRADECIMIENTOS**

Durante este increíble tiempo de vuelta a la universidad, tuve la posibilidad de conocer personas realmente entrañables y que se quedarán grabados en mi corazón eternamente.

Al Dr. Rodrigo López por la confianza, por permitir equivocarme y ser un guía por un camino completamente desconocido para mí. Gracias infinitas por tu comprensión en los distintos momentos de este estudio. Que todo sea alegría en lo que sea que emprendas.

A los Dres. Juan Diego Maya y Jorge Ferreira por toda su experiencia entregada, tener una excelente disposición en solucionar dudas que aunque pequeñas para ellos, para una estudiante permitía conocer aún más del fascinante mundo de la investigación.

A la Dra. Ulrike Kemmerling, muchas gracias de verdad por todo el apoyo y guía que recibí de su parte y también desde su excelente grupo de laboratorio, donde me recibieron como una más de los suyos.

A la distinguida comisión evaluadora de esta tesis que fueron una excelente guía y apoyo. Agradezco las críticas, comentarios y comprensión que permitieron el desarrollo y evolución de la tesis y por empujarme a ser una mejor profesional.

A los Sres. Enrique Moraga, Juan Rivas y al equipo del Bioterio por el apoyo técnico, que fue fundamental en la realización de esta tesis y de todos los trabajos que se realizan en el laboratorio.

A todos aquellos con quienes compartí, reí, lloré y guiaron codo a codo durante la estancia en el laboratorio, sobremesas y aquel bello viaje a Termas de Chillán que siempre tendré como un gran recuerdo: Lorena (aún existe el autito Kinder!), Leo, Caro, María Victoria, Michel, al team cáncer: Lily, Felix, Miguel, Dany, Seba, Piri, y al team

placenta: Anita, Christian, Daniel, Ale, Miguel y Fresia y a todos los que pasaron por los laboratorios, haciendo cada día sumamente feliz.

A la generación de ingreso al Magister en Farmacología 2013, con quienes deformamos nuestros cerebros para conectar con algo totalmente nuevo y desconocido y que tiene a dos de las nuestras en caminos doctorales. Eyllen, Naty y el “compañero fantasma” Jaime, que todo lo que quieran sea vuestro!. Y a grandes amigas que me regalo esta universidad, Valeria y Vicky, Las 3 V, que aunque ya no nos veamos como antes, esta amistad nos mantendrá unidas por siempre! Y Panchi, que aunque no eramos del mismo programa hicimos excelentes migas. Y a todos los que pasaron por allí y nos saludamos y compartimos... Buena suerte para todos!

A mis padres y suegros, sin ellos no hubiese podido coordinar estudio y crianza de un pequeño niño, que siempre estuvo envuelto en un ambiente de cariño y paciencia. Gracias totales por estar ahí.

A Pablo y nuestro hijo Tomás, por soportar mi ausencia, temores, inconvenientes y malos momentos experimentados durante este tiempo. Todo tiene un final y aprendizaje, este viaje confirma nuestra unión, cariño, paciencia y amor. Los quiero montones!



## ÍNDICE

RESUMEN .....	13
SUMMARY .....	14
INTRODUCCIÓN .....	15
Epidemiología de la Enfermedad de Chagas.....	15
<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	19
Mecanismos de transmisión de la Enfermedad de Chagas .....	21
Manifestaciones clínicas.....	22
Tratamiento.....	24
Rol de las poliaminas .....	28
Pentamidina.....	31
HIPÓTESIS .....	34
OBJETIVOS .....	35
Objetivo general.....	35
Objetivos específicos .....	35
MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
Animales .....	36
Fármacos.....	36
Infección con <i>T. cruzi</i> a ratones y parasitemia .....	36
Cuantificación de carga parasitaria por qPCR .....	37
Análisis histopatológico cardíaco.....	38
Análisis estadístico .....	38

RESULTADOS.....	<b>39</b>
Efecto de Pentamidina sobre el tratamiento con Benznidazol en ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>39</b>
Pentamidina no modifica el efecto de Benznidazol en la sobrevida de ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>40</b>
Pentamidina antagoniza el efecto de Benznidazol a dosis baja en la parasitemia de ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>41</b>
Pentamidina no modifica el efecto de Benznidazol en la carga parasitaria en corazones de ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>42</b>
Pentamidina asociada a Benznidazol a dosis baja aumenta la inflamación en corazones de ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>42</b>
Efecto de Pentamidina sobre el tratamiento con Nifurtimox en ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>46</b>
Pentamidina no modifica el efecto de Nifurtimox en la sobrevida de ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>47</b>
Pentamidina no modifica el efecto de Nifurtimox en la parasitemia de ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>48</b>
Pentamidina no modifica el efecto de Nifurtimox en la carga parasitaria en corazones de ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>49</b>
Pentamidina asociada a Nifurtimox a dosis alta aumenta la inflamación en corazones de ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>49</b>
DISCUSIÓN .....	<b>53</b>
CONCLUSIÓN .....	<b>57</b>
BIBLIOGRAFÍA .....	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Estado de la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas en América .....	<b>16</b>
<b>Figura 2.-</b> Tasas de incidencia y mortalidad por Enfermedad de Chagas en Chile entre años 2001 y 2014.....	<b>17</b>
<b>Figura 3.-</b> Distribución geográfica aproximada de los diferentes DTU de <i>Trypanosoma cruzi</i> en ciclos de transmisión doméstico o selvático .....	<b>18</b>
<b>Figura 4.-</b> Ciclo de <i>Trypanosoma cruzi</i> en sus distintos hospedadores.. .....	<b>20</b>
<b>Figura 5.-</b> Estructuras químicas de A) Benznidazol y B) Nifurtimox. ....	<b>24</b>
<b>Figura 6.-</b> Reducción del grupo 2-nitroimidazol de benznidazol por la enzima nitrorreductasa tipo I de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>25</b>
<b>Figura 7.-</b> Reducción de nitrofuranos por las enzimas nitrorreductasa tipo I y tipo II de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	<b>26</b>
<b>Figura 8.-</b> Síntesis y reciclaje de tripanotión.....	<b>29</b>
<b>Figura 9.-</b> Esquema del transporte de poliaminas en <i>T. cruzi</i> . ....	<b>30</b>
<b>Figura 10.-</b> Estructura química de Pentamidina. ....	<b>31</b>
<b>Figura 11.-</b> Tasa de supervivencia de ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> (cepa Y) y tratados con PTM (4 mg/kg), BNZ (5 o 20 mg/kg) y combinaciones. ....	<b>40</b>
<b>Figura 12.-</b> Efecto en la parasitemia en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> (cepa Y) y tratados con PTM (4mg/kg), BNZ (5 o 20 mg/kg) y combinaciones.....	<b>41</b>
<b>Figura 13.-</b> Análisis histopatológico de la carga parasitaria e infiltrado inflamatorio en tejido cardíaco en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> (cepa Y) y tratados con PTM (4 mg/kg), BNZ (5 o 20 mg/kg) y sus combinaciones.....	<b>44</b>

**Figura 14.-** Análisis por qPCR de la carga parasitaria en tejido cardíaco en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (cepa Y) y tratados con PTM (4 mg/kg), BNZ (5 o 20 mg/kg) y sus combinaciones.....**45**

**Figura 15.-** Tasa de supervivencia de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (cepa Y) y tratados con PTM (4 mg/kg), NFX (2 o 10 mg/kg) y sus combinaciones. ....**47**

**Figura 16.-** Efecto en la parasitemia en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (cepa Y) y tratados con PTM (4mg/kg), NFX (2 o 10 mg/kg) y sus combinaciones..... **48**

**Figura 17.-** Análisis histopatológico de la carga parasitaria e infiltrado inflamatorio en tejido cardíaco en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (cepa Y) y tratados con PTM (4mg/kg), NFX (2 o 10 mg/kg) y sus combinaciones.....**51**

**Figura 18.-** Análisis por qPCR de la carga parasitaria en tejido cardíaco en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (cepa Y) y tratados con PTM (4 mg/kg), NFX (2 o 10 mg/kg) y sus combinaciones.....**52**

## RESUMEN

La Enfermedad de Chagas es una patología endémica de Sudamérica causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Su transmisión es principalmente vectorial y de curso agudo o crónico. Ha sido catalogada como una de las enfermedades más desatendidas del mundo. Sin embargo, el interés en esta patología se ha reactivado producto de infecciones no vectoriales en países no endémicos debido a migraciones.

El tratamiento se basa en el uso de dos fármacos: benznidazol y nifurtimox, los cuales generan reacciones adversas que, por su cantidad y severidad, llevan a abandono del tratamiento y consecuentemente a fracaso terapéutico.

Pentamidina, un fármaco utilizado contra leishmaniasis y tripanosomiasis africana, posee moderado efecto antichagásico, pudiendo estar relacionado con la capacidad de inhibir el transporte de poliaminas, lo que podría aumentar el efecto de los fármacos antichagásicos clásicos.

El objetivo de este estudio fue investigar el efecto combinado de pentamidina asociado a fármacos antichagásicos clásicos en un modelo de infección aguda *in vivo*. La evaluación del efecto se realizó mediante determinación de sobrevida y carga parasitaria en sangre (por microscopía directa) y tejido cardíaco (por qPCR). Además, se evaluó la estructura del tejido cardíaco mediante análisis histopatológico, que permitió cuantificar nidos de amastigotes y la infiltración inflamatoria.

Los resultados permiten demostrar que Pentamidina no modifica el efecto de los fármacos antichagásicos clásicos.

## SUMMARY

Chagas disease is an endemic disease of South America caused by the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma cruzi*. The parasite transmission is mainly vectorial and the clinical course of the disease can be acute or chronic. It has been classified as one of the most neglected diseases in the world. However, the interest in this pathology has been reactivated because of non-vector infections in non-endemic countries, due to migrations.

Treatment is based on the use of two drugs: benznidazole and nifurtimox. However, these drugs present adverse reactions that, due to their quantity and severity, lead to treatment dropout and, consequently, therapeutic failure.

Pentamidine, a drug used against Leishmaniasis and African trypanosomiasis, has a moderate antichagasic effect and may be related to the ability to inhibit the transport of polyamines, which could increase the effect of classic antichagasic drugs.

The aim of this study was to investigate the combined effect of pentamidine associated with classic antichagasic drugs in an *in vivo* model of acute infection. The evaluation of the effect was carried out by determination of survival and parasitic load in blood (by direct microscopy) and cardiac tissue (by qPCR). In addition, the structure of the cardiac tissue was evaluated by histopathological analysis, which allowed the quantification of amastigote nests and inflammatory infiltration.

The results showed that Pentamidine does not modify the effect of classical antichagasic drugs.

## INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una patología parasitaria intracelular de curso crónico, producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, que se manifiesta en mamíferos, incluyendo humanos. El principal mecanismo de transmisión es vectorial, mediada por insectos hematófagos triatomíneos, siendo *Triatoma infestans* la especie de mayor importancia en el país.

Se ha descrito presencia de ADN del parásito en momias de la cultura chinchorro que han sido encontradas en costa y valle de la zona norte de Chile y sur de Perú con una data de alrededor de 9.000 años. Sin embargo, la enfermedad fue recién descrita en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas, quién en su reporte original describió el ciclo completo (vector, hospedador, agente infeccioso) y las manifestaciones agudas de un caso clínico humano (Chagas, 1909; Aufderheide *et al*, 2004).

### Epidemiología de la Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas es endémica en 21 países de América, siendo la segunda enfermedad tropical que produce mayor carga económica en Latinoamérica. Considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad desatendida, al estar asociada a condiciones socioeconómicas desfavorables, afectando principalmente poblaciones vulnerables, como grupos indígenas y rurales, niños y ancianos. Sin embargo, el interés en la patología se ha reactivado, debido a que el número de infectados en zonas no endémicas ha aumentado por migración de portadores, quienes transmiten la enfermedad por donación de sangre o trasplante de órganos en regiones que no cuentan con las pruebas de tamizaje rutinarias para su detección, por lo que actualmente se considera como un problema emergente a escala mundial (Coura y Viñas, 2010; Parker y Sethi, 2011; Lee *et al*, 2013).

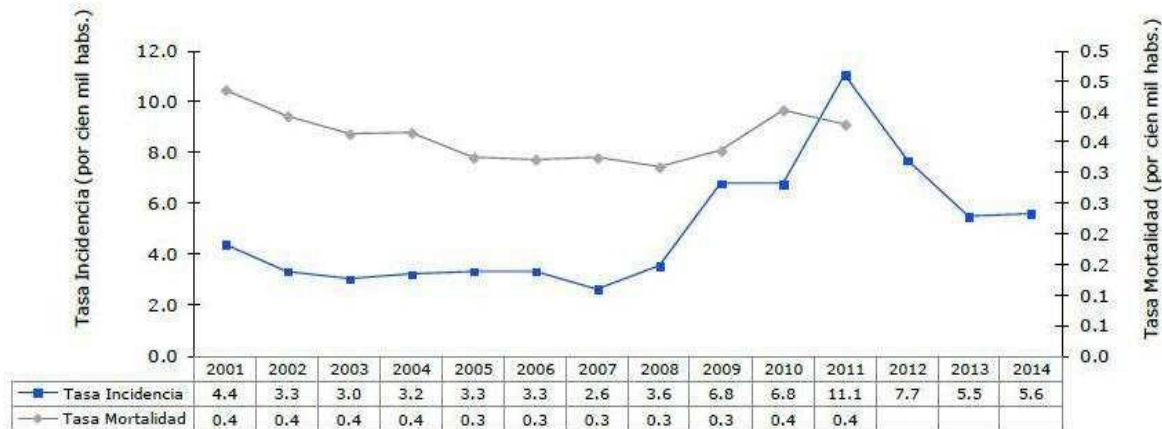
Desde 1990, se han desarrollado medidas de control para disminuir el número de nuevas infecciones en Latinoamérica. Es así, que la transmisión doméstica vectorial se logró interrumpir en Chile, Uruguay, Brasil y en gran parte de América Central (Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua) (Figura 1). Además, en los países endémicos, ha disminuido la infección por transfusión sanguínea debido a detección serológica. Todo esto ha llevado a que la carga de la enfermedad haya disminuido en el último tiempo. Según la OMS (2012), en la década de los '80, se estimaba que 24 millones de personas estaban infectadas. Actualmente, existen aproximadamente 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi*, la mayoría de ellas en América Latina (OMS, 2016).



**Figura 1.-** Estado de la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas en América a Septiembre 2014 (OMS, 2015).



En Chile es una enfermedad de notificación obligatoria, que se encuentra normada por la Circular para la Vigilancia Epidemiológica de la Enfermedad de Chagas (MINSAL, 2011), que incluye la notificación de donantes de sangre (asintomáticos) e infección congénita; su puesta en marcha produjo que el año 2011 hubiese un alza en la tasa de incidencia (Figura 2). Sin embargo, las tasas de mortalidad se han mantenido estables, con cifras entre 0,3 y 0,4 por cada cien mil habitantes (MINSAL, 2015).

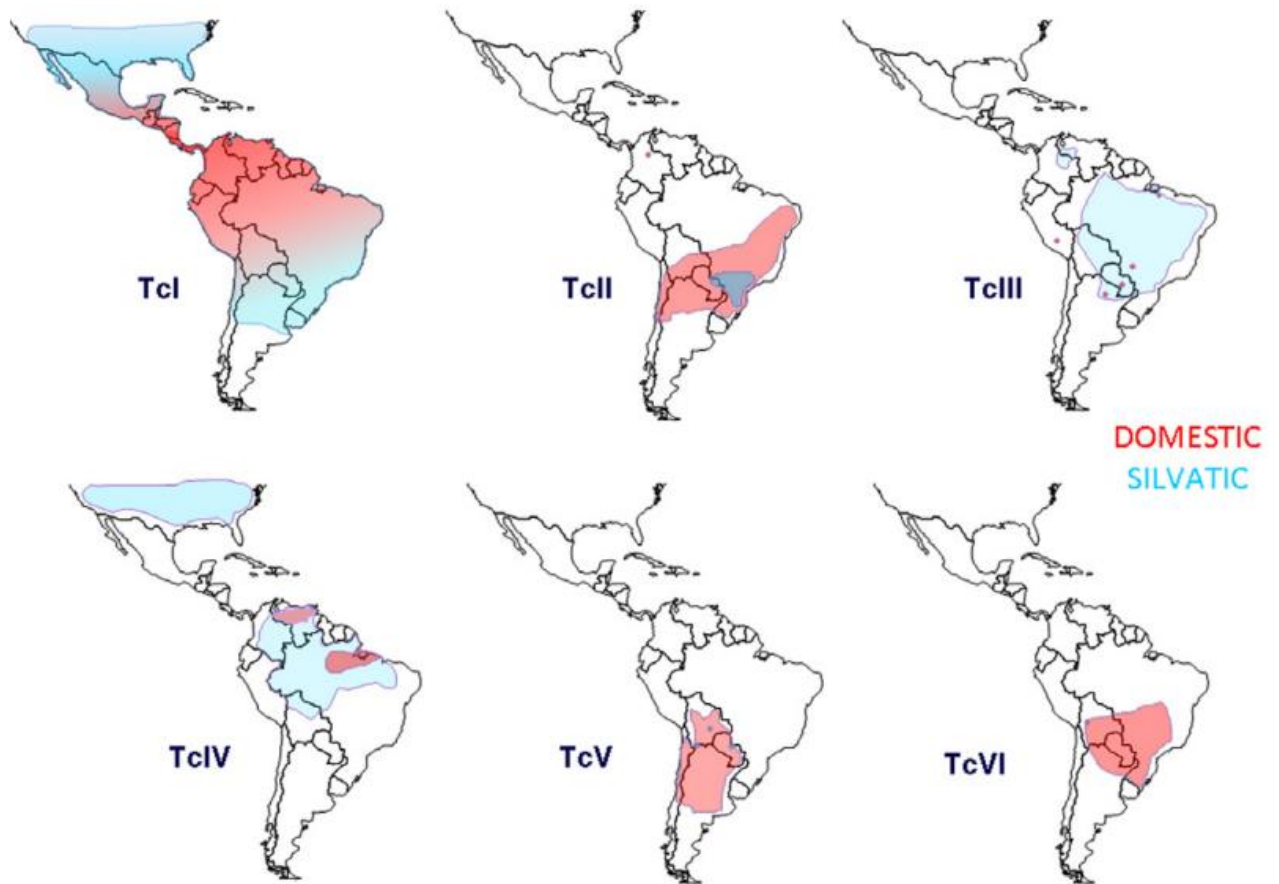


**Figura 2.-** Tasas de incidencia y mortalidad por Enfermedad de Chagas en Chile entre años 2001 y 2014. 2011: último año con datos de mortalidad disponibles (MINSAL, 2015).

### Trypanosoma cruzi

La Enfermedad de Chagas es originada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, parásito perteneciente a la familia de los Tripanosomátidos, incluidos en el orden de los Kinetoplastidos. Se caracterizan por poseer, además de ADN nuclear, ADN mitocondrial (kADN) compuesto por maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos son moléculas de ADN circular homogéneo, mientras que los minicírculos son heterogéneos y están organizados dentro de cuatro regiones conservadas de 120 pares de bases separadas por cuatro regiones hipervariables. Estas regiones conservadas pueden ser amplificadas mediante PCR permitiendo su detección con alta sensibilidad (Apt *et al*, 2008).

Además, se describen 6 linajes dentro la especie, denominados como Unidades Discretas de Tipificación (DTU), siendo categorizadas de TcI a TcVI, con un séptimo linaje en observación (Tcbat), los cuales presentan una distribución determinada, especie de vector preferente, tipo de ciclo (doméstico o selvático) y características clínicas de la enfermedad (Zingales *et al*,2012).



**Figura 3.-** Distribución geográfica aproximada de los diferentes DTU de *Trypanosoma cruzi* en ciclos de transmisión doméstico o selvático (Extraído de Zingales *et al*, 2012).

## Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

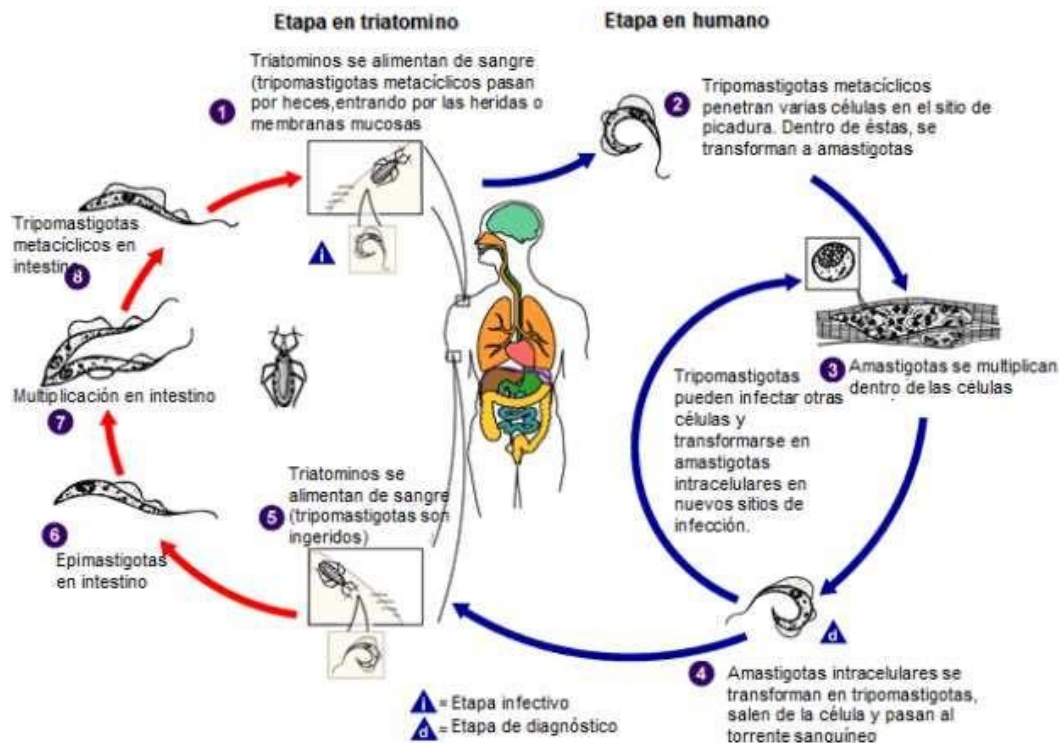
Se diferencian 2 ciclos: selvático o silvestre y doméstico. El ciclo selvático se encuentra en todo el continente americano, albergándose en mamíferos de tamaño pequeño y mediano y en los insectos vectores, observándose un estado de equilibrio desarrollado a través de una larga adaptación, que se traduce en la baja o nula acción patológica del protozoo sobre sus hospedadores silvestres. El ciclo doméstico se desarrolló cuando los humanos entraron en contacto con los focos naturales de infección y perturbaron el medio ambiente, con lo que los triatóminos infectados se trasladaron a las viviendas humanas (OMS, 2002).

A lo largo de su ciclo biológico, *T. cruzi* presenta 3 estadios morfológicos, caracterizados por la presencia y/o ubicación del kinetoplasto y la morfología adoptada en el vector o el hospedero vertebrado (Botero y Restrepo, 1992):

1. Dentro del aparato digestivo del vector, *T. cruzi* adquiere una forma conocida como **epimastigote**. Esta forma posee un flagelo unido cerca del centro del cuerpo, además de un núcleo y un kinetoplasto. Es capaz de multiplicarse y posee un tamaño de 10 a 20 micrones.
2. La forma infectante, generada en el intestino del vector, se denomina **tripomastigote metacíclico**, mientras que la forma flagelada que se encuentra en la sangre de mamíferos infectados se conoce como **tripomastigote sanguíneo**. Ambas formas son alargadas, y su tamaño es de alrededor de 20 micrones de longitud. Poseen un núcleo grande en la parte central y a lo largo de su cuerpo tiene una membrana ondulante bordeada por un flagelo, que se inicia en el kinetoplasto y sale del parásito por el extremo anterior. El kinetoplasto contiene el 20% del ADN total del parásito, aproximadamente, y presenta un tamaño notoriamente grande, lo que constituye una de las principales características morfológicas que lo diferencia de otras especies de tripanosomas.

3. En las células mamíferas hospedadoras, el tripomastigote se transforma en **amastigote**, de forma redondeada u oval, con capacidad replicativa, medir aproximadamente de 1,5 a 4 micrones de diámetro y no presentar un flagelo evidente. Los amastigotes se multiplican dentro de las células formando nidos.

Una vez que ingresan al hospedador mamífero, los tripomastigotes metacíclicos invaden células nucleadas en el sitio de inoculación, como fibroblastos, células epiteliales o macrófagos. La fagocitosis es el principal mecanismo de entrada y se forma la denominada vacuola parasitófora, donde la acidificación de su medio permite la diferenciación de tripomastigote a amastigote que se realizará en el citoplasma de la célula hospedadora, donde realiza su replicación. Luego de 9 ciclos de división (96 horas aproximadamente), los amastigotes se vuelven a transformar en tripomastigotes, rompiendo la célula y liberándose al torrente sanguíneo, donde son capaces de invadir otros tejidos, especialmente, músculo liso y cardíaco (Figura 4) (Dvorak y Hyde, 1973; De Souza *et al*, 2010; Cardoso *et al*, 2016).



**Figura 4.-** Ciclo de *Trypanosoma cruzi* en sus distintos hospedadores. El ciclo muestra sus 3 estadios morfológicos: tripomastigote, amastigote y epimastigote.

## **Mecanismos de transmisión de la Enfermedad de Chagas**

En el hombre, la infección puede ser vectorial, transplacentaria o vertical, por transfusión sanguínea, por trasplante de órganos, oral o por accidentes de laboratorio.

**Transmisión vectorial:** es la principal forma de transmisión, mediada por insectos vectores pertenecientes a la subfamilia Triatominae, especialmente *Triatoma infestans*. Este insecto hematófago parece no verse afectado por la infección con *T. cruzi* y la carga parasitaria aumenta por cada consumo de sangre infectada durante cualquier estado de su vida. El ciclo comienza con insectos triatominos que succionan sangre de mamíferos infectados con tripomastigotes circulantes. Una vez ingeridos, la mayoría de ellos se transforman a epimastigotes en el estómago del insecto, los cuales migran al intestino y se adhieren a la membrana perimicrovilar de las células intestinales, dividiéndose intensamente. Esta adhesión parece ser importante para gatillar la transformación a tripomastigote metacíclico, los cuales son liberados junto a las heces y orina del insecto; esta forma es altamente infectante y, en mamíferos, el ingreso puede ser por inoculación directa en mucosa ocular o por piel lesionada durante la succión del insecto (Rassi *et al*, 2010).

**Transmisión transplacentaria:** la mujer embarazada infectada con *T. cruzi* puede transmitir el parásito en cualquier etapa de la enfermedad; también es posible la infección durante el parto, pero se considera como forma excepcional. Los bebés infectados por esta vía están asociados a partos prematuros, menor peso al nacer y mortinatos. Se estima que la transmisión por esta vía es entre un 2,6% y un 11%. Actualmente, es el mecanismo de transmisión más importante en Chile (Kemmerling *et al*, 2010).

**Transmisión por transfusión sanguínea y trasplante de órganos:** se define como la transmisión del parásito por medio de un dador infectado a un receptor sano por transfusión de sangre o sus derivados o trasplante de órganos. Es el mecanismo de infección de mayor importancia en países donde la enfermedad no es endémica. Esta

forma es posible de prevenir mediante la detección en sangre donada y en órganos infectados (obligatorio en Chile) (MINSAL, 2015).

**Transmisión oral:** esta forma se considera como emergente, y se ha detectado en brotes por ingesta de alimentos crudos sin pasteurizar o mal cocidos, contaminados con deyecciones de insectos infectados, o en carne de animales hospederos de *T. cruzi*. El parásito puede permanecer viable algunas horas en ambientes húmedos estando presente en jugos de frutas y leche en países tropicales. Actualmente, se considera una de las formas de transmisión más importante a lo largo del Amazonas (Toso *et al*, 2011).

**Accidentes de laboratorio:** personal que trabaja con *T. cruzi* o insectos infectados pueden verse involucrados en accidentes de laboratorio, donde es posible la infección por medio de manipulación de sangre infectada, heces del insecto triatomino infectado o de cultivos, mediante lesiones punzantes (agujas, vidrio quebrado) o lesiones preexistentes en piel o mucosas. Esta forma de transmisión se considera muy rara (Herwaldt, 2001).

## **Manifestaciones clínicas**

La Enfermedad de Chagas se divide en 3 fases clínicas: aguda, indeterminada o latente y crónica.

**Fase aguda:** puede tener una duración entre 4 y 8 semanas, siendo posible encontrar la mayor cantidad de parásitos circulantes. En esta fase *T. cruzi* puede invadir diversos órganos y multiplicarse.

Si el individuo infectado es inmunocompetente, puede cursar esta fase de forma asintomática o presentar signos y síntomas generales; en menos del 50% se presenta la signología característica de ingreso del parásito, que puede ser una reacción inflamatoria local de piel (chagoma) o, si el ingreso es por vía mucosa conjuntival se

produce edema periorbital (signo de Romaña). Pacientes inmunocomprometidos y ancianos pueden cursar con cuadros más severos con signología asociada a daño cardíaco, expresada principalmente como arritmias. La mortalidad de esta fase es de alrededor del 10%, producto de falla cardíaca, meningitis o encefalitis (Punukollu *et al*, 2007; Yacoub *et al*, 2008).

**Fase indeterminada o latente:** esta fase puede durar de 5 a 30 años, y se caracteriza por *i*) serología positiva o demostración parasitológica de *T. cruzi*, *ii*) ausencia de signos clínicos de la Enfermedad de Chagas, *iii*) ausencia de anormalidades electrocardiográficas y, *iv*) corazón, esófago y colon sin alteraciones radiográficas. Esta fase es detectada cuando el paciente infectado dona sangre y se realizan las pruebas serológicas correspondientes (Punukollu *et al*, 2007).

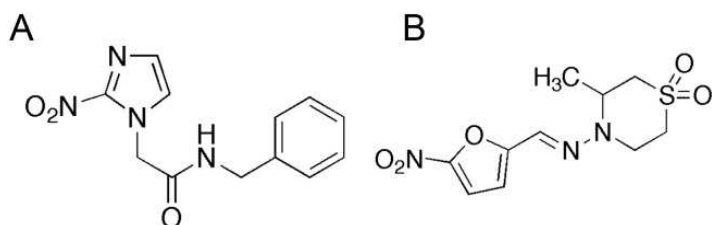
**Fase crónica:** se puede presentar luego de más de 30 años de adquirida la enfermedad y se caracteriza por la aparición de manifestaciones digestivas y/o cardíacas (Rassi *et al*, 2009).

En cuanto a la presentación digestiva, se observan alteraciones en las funciones motoras, secretoras y de absorción del tracto gastrointestinal, con lesiones en el sistema nervioso entérico. La denervación afecta principalmente a esófago y colon distal y es causante de acalasia y pérdida de coordinación motriz, lo que impide la evacuación de material semisólido, provocando la dilatación y el consecuente desarrollo de megaesófago y megacolon (Rassi *et al*, 2012).

La cardiopatía chagásica crónica es la manifestación más grave y la principal causa de muerte de la enfermedad y se desarrolla en el 30% de los pacientes infectados. Inicialmente, existe dilatación por la previa e intensa multiplicación de los parásitos en las fibras musculares del corazón, lo cual originará una posterior miocarditis, con desintegración de la fibra miocárdica. Además, la inflamación alcanza el subendocardio, tejido adiposo del epicardio y los ganglios nerviosos. A nivel del tejido de conducción, se puede encontrar edema e infiltrado leucocitario (Atías y Apt, 1991).

## Tratamiento

El tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas se basa en el uso de Benznidazol y Nifurtimox (Figura 5).



**Figura 5.-** Estructuras químicas de A) Benznidazol y B) Nifurtimox.

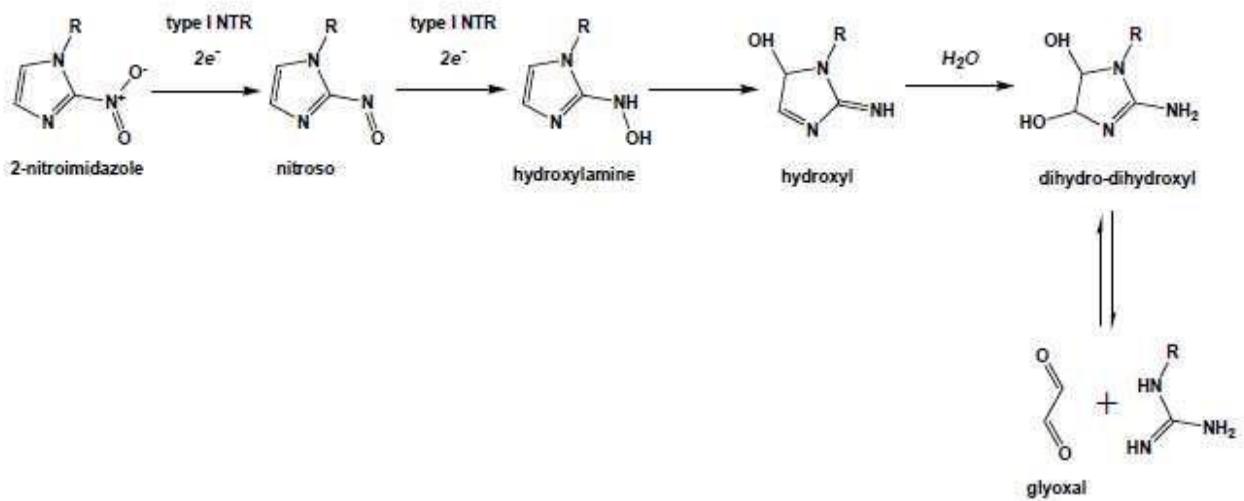
**Benznidazol (BNZ):** Tripanocida derivado de la clase de los 2- nitroimidazoles. Indicado para el tratamiento de la fase aguda, en caso de reactivación en individuos inmunosuprimidos, en niños que padecen infección congénita y en pacientes sin compromiso orgánico; además, se utiliza de manera preventiva en embarazadas para evitar transmisión vertical. Estudios *in vitro* demuestran una actividad anti-*T. cruzi* de 60-90%, variación dependiente de la cepa a tratar (Luna *et al*, 2009; OMS, 2015).

**Nifurtimox (NFX):** tripanocida análogo de nitrofuranos, con valores de eficacia parasitológica de aproximadamente un 76% en la fase aguda. Su uso en Enfermedad de Chagas se encuentra aprobado desde 1965 (Apt *et al*, 2008).

Ambos fármacos nitroheterocíclicos son prodrogas y su activación se realiza en una reacción independiente de oxígeno mediada por una enzima presente en *T. cruzi*, llamada nitroreductasa tipo I (*TcNTR I*), que reduce los grupos nitro de los fármacos, que luego llevará a la formación de metabolitos citotóxicos:

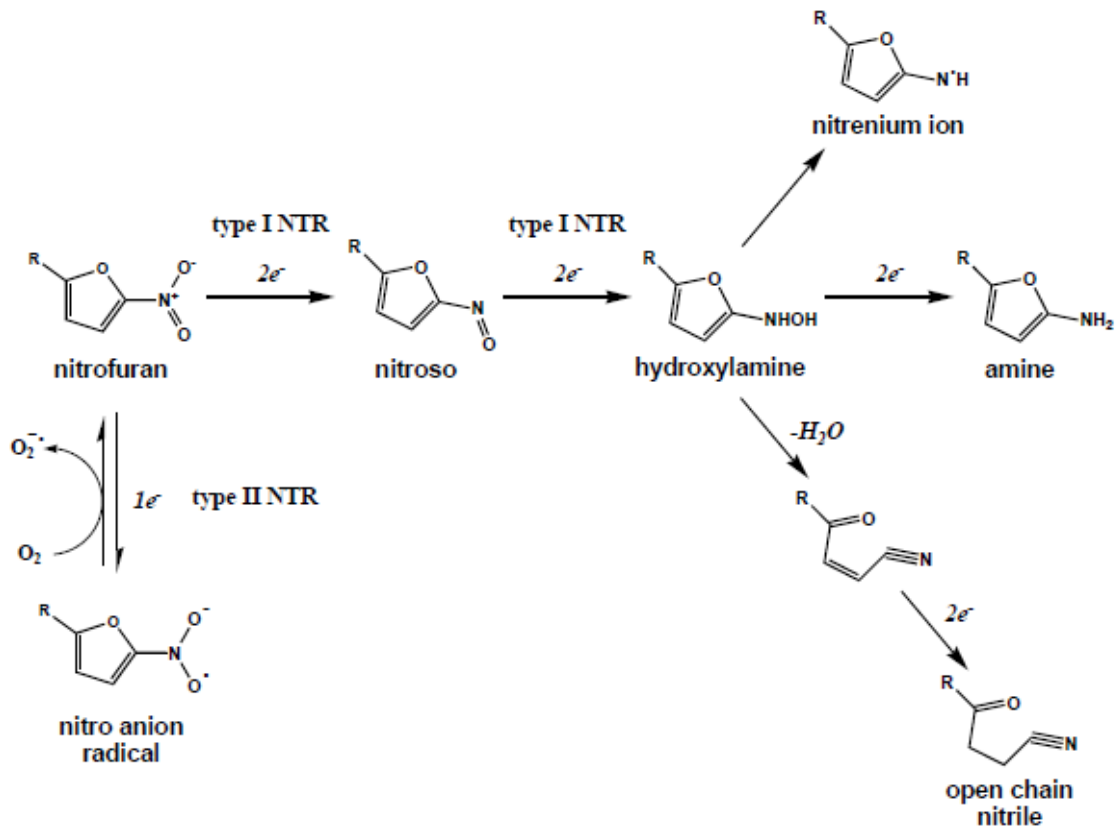


En la reducción del BNZ, el grupo nitro conservado del anillo imidazol es reducido, generando un derivado de hidroxilamina. A pH fisiológico, la hidroxilamina forma ión nitrenio, el cual se descompone espontáneamente en un metabolito hidroxilo, que luego de hidratarse pasa a ser un derivado dihidro-dihroxilo que se puede fragmentar formando glioxal, que es un compuesto citotóxico y mutagénico, que daña cadenas de aminoácidos, inhibe enzimas, forma aductos con ácidos nucleicos y promueve entrecruzamiento de ADN (Figura 6) (Wilkinson *et al*, 2011; Hall y Wilkinson, 2012).



**Figura 6.-** Reducción del grupo 2-nitroimidazol de benzimidazol por la enzima nitrorreductasa tipo I de *Trypanosoma cruzi* (Extraído de Wilkinson *et al*, 2011).

En el caso de NFX, al igual que BNZ, la TcNTR I reduce el grupo nitro del anillo nitrofurano, generando un derivado de hidroxilamina, el cual puede ser descompuesto por diversas vías como: la formación de ión nitrenio, reducción a amina o clivaje del anillo furano, formando primero un nitrilo de cadena abierta insaturada y luego saturada. Esta última, es la responsable de la toxicidad en tripomastigotes de *T. cruzi* al generar efectos pleiotrópicos, como la inhibición de la actividad enzimática, modificación de los niveles de tioles y daño al ADN que lleva a muerte celular. Además, hay formación de radicales nitroaniones desde NFX por nitrorreductasa tipo II (dependiente de oxígeno) (Figura 7) (Coura y de Castro, 2002; Hall *et al*, 2011).



**Figura 7.-** Reducción de nitrofuranos por las enzimas nitrorreductasa tipo I y tipo II de *Trypanosoma cruzi* (Extraído de Hall y Wilkinson, 2012).

No obstante, estos fármacos pueden causar reacciones adversas de diversos grados, que pueden llevar a suspensión del tratamiento y el consiguiente fracaso terapéutico. BNZ puede producir signos dermatológicos (erupciones cutáneas, dermatitis alérgica), digestivos (nauseas, trastornos gastrointestinales), hematológicos (manifestaciones de depresión de médula ósea, como leucopenia y trombocitopenia) y/o neurológicos (parestesias, polineuropatía, polineuritis periférica). A su vez, NFX puede producir anorexia, pérdida de peso, excitabilidad/somnolencia y manifestaciones digestivas como nauseas, vómito y, ocasionalmente, cólico intestinal y diarrea (Coura y de Castro, 2002; Apt et al, 2008).

Además, se describe que estos dos fármacos producen mutagénesis y daño al ADN del hospedador, por lo que hay dudas acerca del beneficio de su uso. Sin embargo, en grandes series de pacientes tratados con estos fármacos, no se ha encontrado mayores problemas relacionados con las reacciones adversas mencionadas anteriormente. Por otro lado, también se ha reportado diferencia de susceptibilidad entre cepas para estos dos agentes, lo que introduce un elemento adicional que complica el manejo farmacológico de esta enfermedad (Filardi y Brener, 1987; Zahoor et al., 1987; Gorla et al., 1989; Apt, 1999).

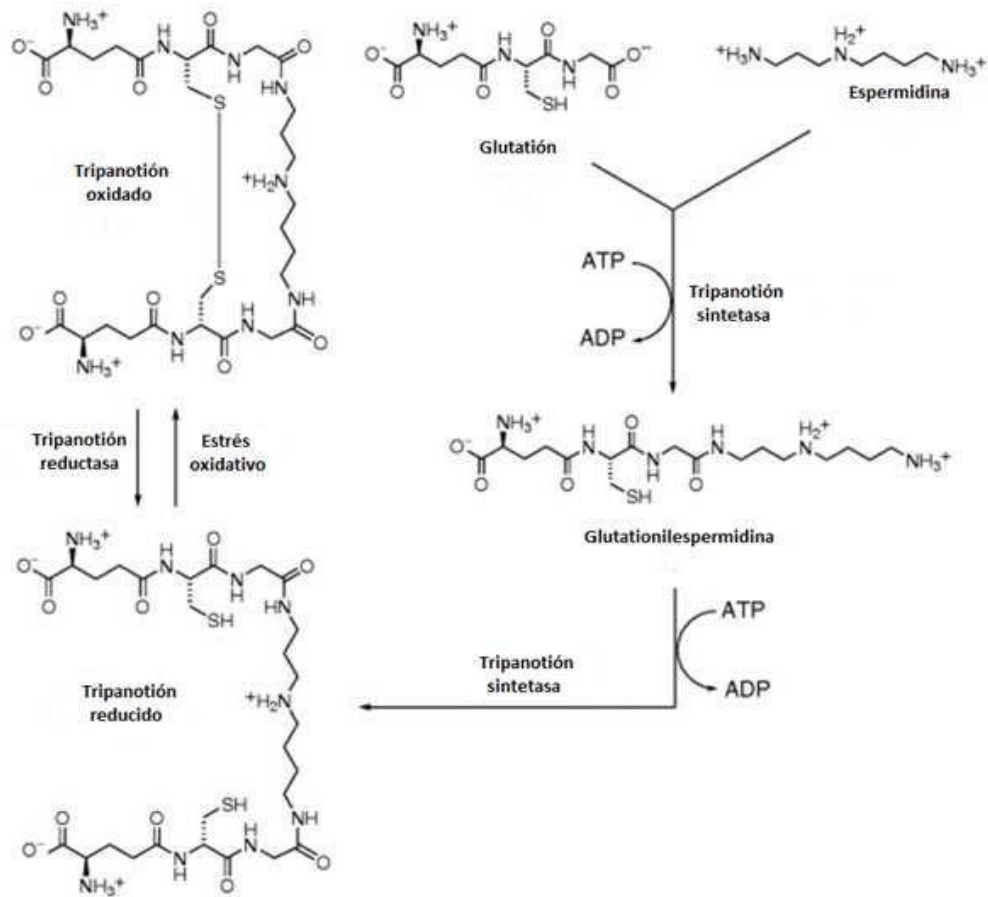
En razón de lo anteriormente expuesto, se han evaluado una serie de compuestos, nuevos o ya aprobados, en relación a determinar su efecto antichagásico tanto solos como asociados a los fármacos antichagásicos clásicos. Por lo que se han estudiado distintos blancos terapéuticos, como, por ejemplo, metabolismo de purinas o síntesis de moléculas propias de *T. cruzi* como ergosterol y tripanotión, obteniendo resultados dispares (Apt, 1999; Faúndez et al, 2008; Díaz et al, 2014).

## Rol de las poliaminas

Las poliaminas naturales son moléculas ubicuas requeridas para el crecimiento, diferenciación y proliferación celular. Los mamíferos son capaces de sintetizar putrescina, espermidina y espermina. Su síntesis proviene del metabolismo de L-arginina, que por medio de arginasa se transforma a L-ornitina, luego ésta, a través de la enzima ornitina decarboxilasa (ODC) se convierte en putrescina, precursor de espermidina (a través de la espermidina sintasa) y, finalmente, espermina por la espermina sintasa (Pegg, 2009; Pegg, 2014).

En *T. cruzi*, las poliaminas son esenciales para la síntesis de tripanotión ( $T(SH)_2$ ), principal tiol encargado del balance redox en el parásito, ya que permite su sobrevivencia en el medio intracelular, al reducir agentes oxidantes como los iones superóxido y peroxinitrito, defendiéndose del ataque de la célula hospedadora y permitiendo su multiplicación (Peluffo *et al*, 2004; Algranati, 2010).

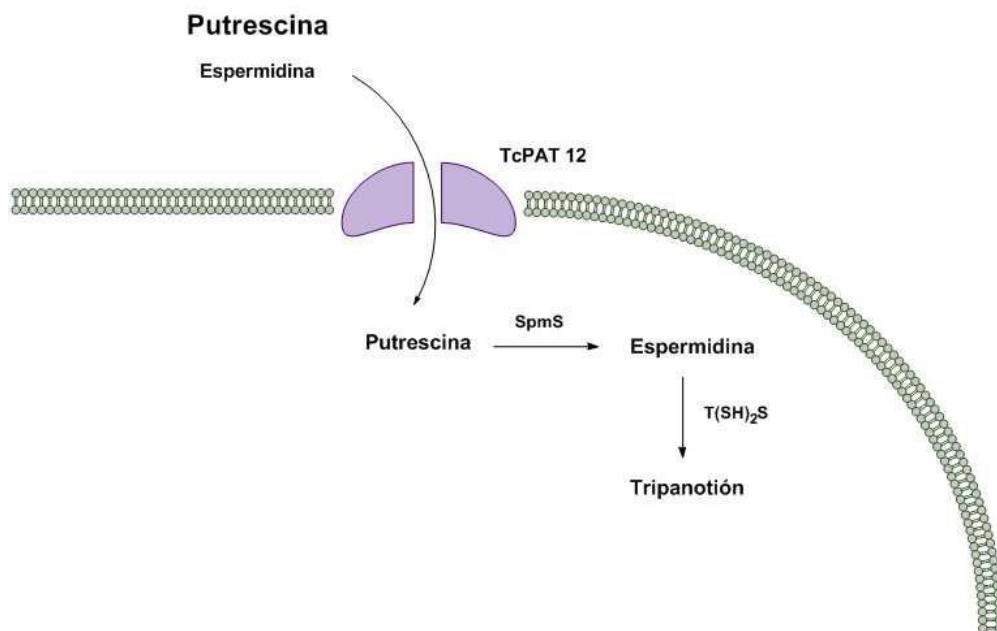
La síntesis de  $T(SH)_2$  tiene 2 etapas, ambas catalizadas por tripanotión sintasa ( $T(SH)_2S$ ). En el primer paso, se unen covalentemente una molécula de glutatión y una de espermidina, formando glutationil-espermidina; en la siguiente etapa, se une una segunda molécula de glutatión al grupo amino libre de glutationil-espermidina formando  $T(SH)_2$ . La actividad de  $T(SH)_2$ , asociada a Tripanotión reductasa forman el complejo más importante en la defensa antioxidante del parásito (Figura 8) (Müller *et al*, 2003).



**Figura 8.-** Síntesis y reciclaje de tripanotión (Adaptado de Woster, 2010).

Gran parte de la evidencia, indica que *T. cruzi* no puede sintetizar putrescina, por deficiencia de ornitina descarboxilasa. En cuanto a espermidina, la evidencia sugiere dos vías por las que puede ser obtenida: por síntesis desde putrescina al interior del parásito o del ingreso directo desde el exterior. Como putrescina también es captada desde el exterior del parásito, es claro que la principal ruta de obtención de poliaminas es desde el medio externo a través de transportadores específicos que permiten su internalización (Heby *et al*, 2003; Algranati, 2010; Hasne *et al*, 2010).

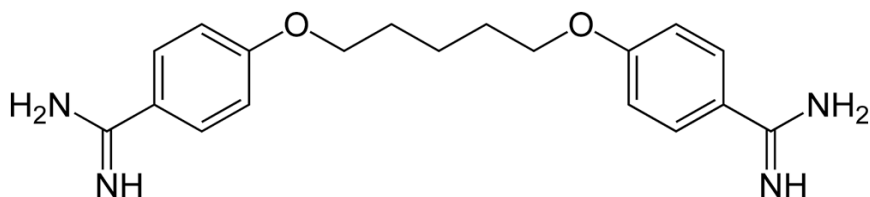
Se ha descrito la presencia de transportadores de poliaminas en *Leishmania major*. *LmPOT1* es un transportador de alta afinidad a putrescina y espermidina (Hasne y Ullman, 2005). En *T. cruzi*, se ha descrito un gen ortólogo que codifica un transportador denominado *TcPAT12* (Figura 9), el cual presenta un 55% de similitud en la secuencia aminoacídica con *LmPOT1* (Carrillo *et al*, 2006), demostrando tener una alta afinidad a putrescina y en menor medida de espermidina. Además, la actividad y ubicación subcelular de los transportadores fue influenciada por la disponibilidad de putrescina en el medio (Hasne *et al*, 2010).



**Figura 9.-** Esquema del transporte de poliaminas en *T. cruzi*. El transportador *TcPAT12* permite el ingreso de putrescina en mayor proporción y en menor medida de espermidina. Esto permite la síntesis de tripanotión por parte de la enzima tripanotión sintasa. SpmS: espermidina sintasa, T(SH)<sub>2</sub>S: tripanotión sintasa.

## Pentamidina

Pentamidina (PTM) es una diamina aromática (Figura 10), clasificada como antiparasitario de amplio espectro, siendo utilizada en el tratamiento de neumonía por *Pneumocystis carinii*, leishmaniasis (visceral y cutánea) y tripanosomiasis africana. El tratamiento usual involucra inyecciones diarias por 7-10 días y una vez administrado es rápidamente metabolizado por el sistema citocromo P450 del mamífero hospedero y no del parásito, se excreta por vía urinaria y su vida media es de 6-9 horas. PTM se carga positivamente cuando se distribuye, por lo que se une extensamente a las proteínas plasmáticas para ser transportada. No atraviesa membranas biológicas y llega muy lentamente al líquido cerebroespinal (Schoenbach y Greenspan, 1948; Sanderson *et al*, 2009; Wilkinson y Kelly, 2009).



**Figura 10.-** Estructura química de Pentamidina.

Su mecanismo de acción no se encuentra totalmente dilucidado, pudiendo interactuar con moléculas aniónicas y unirse al ADN. Además, se ha propuesto que PTM inhibe la actividad de topoisomerasa II mitocondrial (Shapiro y Englund, 1990).

En estudios recientes se ha demostrado que PTM bloquea *LmPOT1* de *L. major*, de alta similitud aminoacídica con *TcPAT12*, sugiriendo que también podría bloquear el transportador de *T. cruzi*, inhibiendo vías metabólicas para la síntesis de tripanotión desde la captación de poliaminas, por lo tanto, tener actividad antichagásica (Carrillo *et al*, 2006; Hasne *et al*, 2010). De este modo, debido a que *T. cruzi* no puede sintetizar putrescina, el bloqueo del transportador impediría el ingreso de estas poliaminas, imposibilitando al parásito de sintetizar T(SH)<sub>2</sub>. Además, se plantea que PTM ejerce efecto tripanostático, no solo por la inhibición del transporte de poliaminas, sino

también por su capacidad de unión al surco menor de la doble hélice del ADN (Edwards *et al*, 1992; Díaz *et al*, 2014).

En estudios *in vitro*, se ha descrito que PTM disminuye la viabilidad de tripomastigotes aislados de *T. cruzi* con una potencia similar a BNZ y NFX, observándose, mediante citometría de flujo, que la cepa Y (DTU: TcII) es sensible a PTM con un IC<sub>50</sub> de 5 µM. Adicionalmente, PTM, a pesar de no disminuir el número de células infectadas, disminuyó la carga de amastigotes por célula, observado mediante tinción de núcleo con sonda DAPI y qPCR, obteniendo una consiguiente disminución de liberación de tripomastigotes en el medio, comportándose de manera similar a los fármacos antichagásicos clásicos (Díaz *et al*, 2014).

*In vivo*, al infectar ratones BALB/c con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y (DTU: TcII) y tratados con PTM (8 mg/kg/día por 10 días), se observó aumento significativo de la supervivencia y disminuyó el pico de parasitemia característico al día 14 post-infección. Adicionalmente, se realizó análisis histopatológico de corazón donde se observó que a la dosis mencionada disminuye el infiltrado inflamatorio, edema y nidos de amastigotes, en comparación a una dosis menor (4 mg/kg/día por 10 días) donde no se observaron cambios con respecto al control sin tratamiento. Además, PTM (8 mg/kg/día por 10 días) disminuyó la carga de parásitos en corazón mediante qPCR (Díaz *et al*, 2014).

Para evaluar el posible mecanismo de acción de PTM sobre *T. cruzi* asociado al transporte de poliaminas, en epimastigotes y amastigotes de *T. cruzi* cepa Y (DTU: TcII) se utilizaron poliaminas radiomarcadas (putrescina y espermidina), disminuyendo la concentración de putrescina al interior del parásito en razón de un 85% en epimastigotes y de un 81% en amastigotes. En cuanto a espermidina, se logró una inhibición de transporte de 39% en epimastigotes y amastigotes (Díaz *et al*, 2014).

Aunque PTM es bien tolerada en la mayoría de los pacientes, también presenta altos índices de toxicidad; se ha descrito hipotensión, hipoglucemia, taquicardia, nefrotoxicidad y cefalea. También se han reportado cuadros más severos, como



disfunción hepática y pancreática y síndrome Stevens-Johnson (eritema multifocal mayor). La ocurrencia y severidad de los efectos adversos es dosis-dependiente, principalmente, en dosis sobre los 4 mg/kg/día (Babokhov *et al*, 2013).

## HIPÓTESIS

Dado que:

- La terapia actual de la enfermedad de Chagas, basada en Benznidazol y Nifurtimox, posee altos índices de fracaso terapéutico producto de reacciones adversas.
- *Trypanosoma cruzi* es un parásito auxótrofo para putrescina, poliamina necesaria en la ruta sintética del tripanotión, eje de su metabolismo redox.
- Pentamidina bloquea selectivamente el transporte de putrescina y espermidina y ha demostrado eficacia antichagásica en estudios *in vitro* e *in vivo*.

Se planteó la siguiente hipótesis:

**Pentamidina a 4 mg/kg/día potencia la actividad antichagásica de Benznidazol y Nifurtimox en un modelo *in vivo* de infección aguda por *Trypanosoma cruzi*.**

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar el efecto de Pentamidina y las drogas antichagásicas Nifurtimox o Benznidazol, solas y combinadas, en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto de Pentamidina y sus combinaciones en la carga parasitaria y sobrevivencia de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.
2. Evaluar el efecto de Pentamidina y sus combinaciones sobre tejido cardíaco en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.
3. Evaluar el efecto sinérgico de las diferentes combinaciones de fármacos en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales**

Ratones BALB/c machos de 20-25 g, se mantuvieron en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile en grupos de 6 animales en cajas de policarbonato transparente con alimento y agua *ad-libitum*. El manejo de los animales se realizó de acuerdo a los principios de las normas internacionales para investigación biomédica que involucra el uso de animales. Todos los protocolos usados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Bioética sobre Investigación en Animales (Protocolo CBA# 0448 FMUCH, Aprobado para el proyecto FONDECYT 11110182, que financió esta Tesis).

### **Fármacos**

Pentamidina isetionato se obtuvo de Sigma-Aldrich, se preparó diariamente con solución salina 0,9% para una administración intraperitoneal de 4 mg/kg. Nifurtimox (Lampit<sup>®</sup>, Bayer) y Benznidazol (Radanil<sup>®</sup>, Roche) preparados diariamente para su administración en agua de bebida en dosis de 2 y 10 mg/kg de Nifurtimox y 5 y 20 mg/kg de Benznidazol.

### **Infección con *T. cruzi* a ratones y parasitemia**

Para la infección, los ratones recibieron por vía intraperitoneal 0,5 mL de sangre con citrato de sodio al 2,8% proveniente de ratones previamente infectados con *T. cruzi* (cepa Y; DTU TcII). La cantidad de parásitos a recibir fue de aproximadamente 30.000 tripomastigotes en total, contados por microscopía directa. La calidad de la infección y

el efecto de los fármacos fueron determinados mediante parasitemia y sobrevivencia de los ratones a distintos tiempos post- infección. Parasitemia fue evaluada por conteo de tripomastigotes en muestras de sangre periférica obtenidas de vasos coccígeos por microscopía directa (Faúndez *et al*, 2008). Los ratones fueron observados diariamente para evaluar sobrevivencia. Los individuos que se encontraron vivos al día 18 post- infección fueron eutanasiados para el procesamiento de muestras de tejido cardiaco para qPCR e histopatología. La eutanasia se realizó mediante administración de la asociación de ketamina/xilazina (85 y 30 mg/kg, respectivamente), por vía intraperitoneal.

### **Cuantificación de carga parasitaria por qPCR**

Los corazones de ratones infectados fueron homogeneizados y se extrajo el ADN utilizando Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN parasitario se efectuó usando la sonda TcSt (5'-/56-FAM/ATCAGCCGAGTGCAGCACCTTG/3BHQ\_1/-3') y los partidores TcSt4-Fw (5'GGACCACAACGTGTGATGCA-3') y TcSt1-Rev (5'AGGAATTCGCGAGCTCTTG-3'), diseñados para amplificar una secuencia satélite de ADN de *T. cruzi*. Para cuantificar el ADN mamífero se utilizó la sonda MM (5'/5HEX/AAAGCATCTGCCTCCG/3BHQ\_1/-3') y los partidores MUS-F (5'GCAAAGCCTGACAACCTTCTGA-3') y MUS-R (5'CCAACGTCCCAGCTTAAGTAGAAT-3') que amplifican el gen GAPDH de *Mus musculus* como control de carga. La amplificación por qPCR se desarrolló en el equipo 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Todas las reacciones se ejecutaron usando 10 ng de ADN usando Sensi Mix SYBR Hi-Rox® Kit (Bioline, UK), volumen final de 20 µL. Para ambos pares de partidores, los ciclos térmicos consistieron en un ciclo inicial de 10' a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15" a 95°C y 45" a 55°C. La fluorescencia fue medida al final de cada ciclo de amplificación. Finalmente, se efectuó una curva de disociación entre 55 y 95°C. Todos los datos fueron analizados por el método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak y Schmittgen, 2001), que compara el CT de la amplificación del gen de *T. cruzi* versus el de GAPDH,

comparando a la vez todas las muestras con el control. La carga parasitaria se expresa como la carga de ADN relativo comparada con el control.

### **Análisis histopatológico cardíaco**

Los corazones fueron extraídos al momento de la muerte antes del fin del estudio o al día 18 post infección en sobrevivientes. Las muestras fueron fijadas en paraformaldehído al 10% en buffer fosfato (0,1 M, pH 7,3) por 24 horas, deshidratadas en alcohol, clarificadas en xileno y embebidas en parafina. Luego, se obtuvo secciones de 5  $\mu$ M que fueron teñidas con hematoxilina-eosina para análisis histológico de rutina y cuantificación de nidos de amastigotes e infiltrado inflamatorio. Fueron evaluadas al menos 4 imágenes no consecutivas de las fotografías de tejido de diferentes ratones.

### **Análisis estadístico**

Para todos los experimentos realizados, la significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ . Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar (DE) de duplicados. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (v 6.0). La distribución normal de los datos se evaluó mediante análisis de D'Agostino-Pearson. Se realizó ANOVA de dos vías con post- test de Bonferroni. Para el análisis de sobrevida, se realizó la prueba log-rank (Mantel Cox).

## RESULTADOS

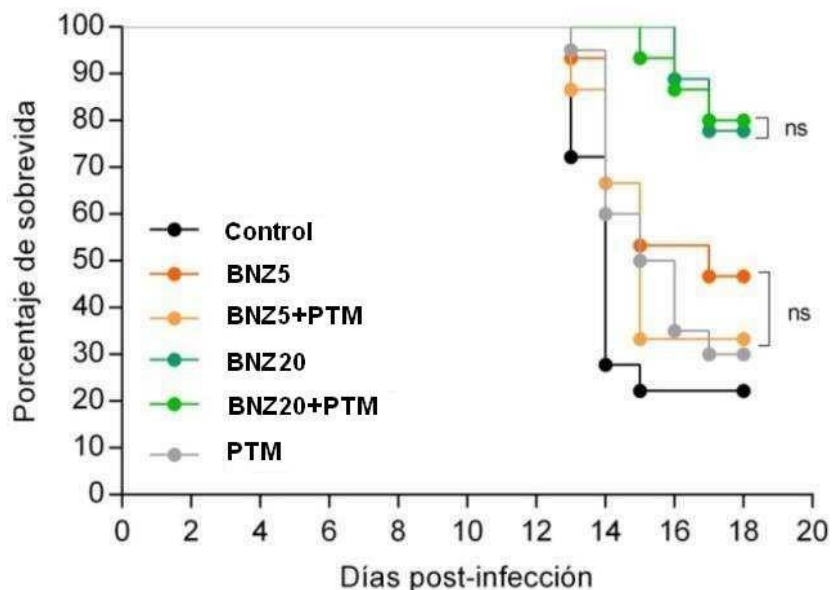
Para una visualización más clara de cada tratamiento, se separaran de manera que el primer grupo de resultados corresponderá a PTM asociada BNZ y, más adelante, se mostrarán los resultados de PTM asociada a NFX.

### **Efecto de Pentamidina sobre el tratamiento con Benznidazol en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi***

Se infectaron ratones BALB/c con tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y; DTU TcII) por vía intraperitoneal. Los tratamientos se realizaron por 15 días iniciando el día 2 post-infección. BNZ fue administrado por vía oral en agua de bebida, usando dos dosis: 5 y 20 mg/kg/día. PTM (4 mg/kg/día) se administró por vía intraperitoneal. La eficacia del tratamiento fue seguida a través de la obtención de tasa sobrevida y presencia de parásitos en sangre (parasitemia) y en tejido cardiaco (análisis histopatológico y qPCR).

## Pentamidina no modifica el efecto de Benznidazol en la sobrevida de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*

En la figura 11, PTM asociada a BNZ 5 mg/Kg/día (BNZ5+PTM) no presentó diferencia significativa en comparación con el grupo de ratones tratados con BNZ5, observando una sobrevida media de 17 días en el grupo BNZ5 y de 15 días en BNZ5+PTM comportándose de manera similar al grupo control infectado (15 días) y PTM (15,5 días). Los grupos tratados con BNZ 20 mg/kg/día (sólo o asociado) no presentaron diferencias entre ellos, con una sobrevida media indeterminada, demostrando la eficacia de la dosis de BNZ.

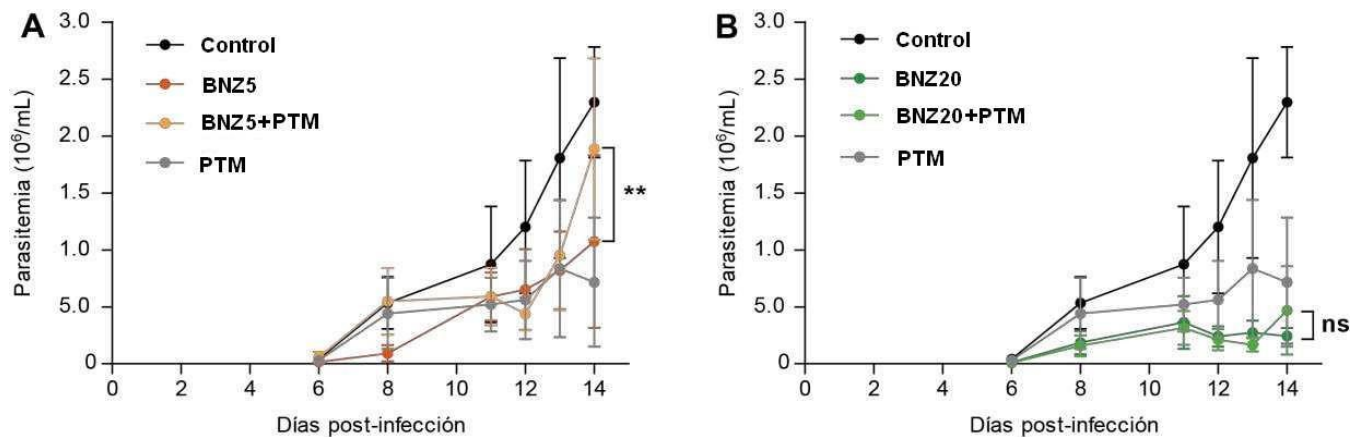


**Figura 11.- Tasa de sobrevida de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (cepa Y) y tratados con PTM (4 mg/kg), BNZ (5 o 20 mg/kg) y combinaciones.** La sobrevida fue evaluada diariamente hasta el día 18 post-infección. Gráfico resume dos experimentos independientes con n=6 cada uno. La comparación estadística entre grupos se calculó con la prueba log-rank (Mantel Cox). ns: no significativo. PTM: Pentamidina 4 mg/kg; BNZ5: Benznidazol 5 mg/kg; BNZ5+PTM: Benznidazol 5 mg/kg asociado a Pentamidina; BNZ20: Benznidazol 20 mg/kg; BNZ20+PTM: Benznidazol 20 mg/kg asociado a Pentamidina.



## Pentamidina antagoniza el efecto de Benznidazol a dosis baja en la parasitemia de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*

En cuanto a parasitemia (Figura 12), BNZ5+PTM presentó un comportamiento antagónico sobre la carga parasitaria en sangre de ratones, es así que al tratar a los animales con BNZ5 se produjo una disminución de la parasitemia, efecto que fue revertido al incluir PTM. Además, en relación a lo observado con el grupo PTM, no presentó diferencia significativa con BNZ5, sin embargo, si hubo diferencia con respecto a BNZ5+PTM ( $p < 0,01$ ). Este antagonismo no se evidenció en el caso de BNZ20, donde, tanto sólo como asociado, se apreció una disminución significativa de parásitos circulantes.



**Figura 12.- Efecto en la parasitemia en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (cepa Y) y tratados con PTM (4mg/kg), BNZ (5 o 20 mg/kg) y combinaciones.** (A) Parasitemia en ratones infectados y tratados con PTM, BNZ5 y combinaciones. (B) Parasitemia de ratones infectados y tratados con PTM, BNZ20 y combinaciones. El gráfico resume 2 experimentos independientes con un  $n=6$  cada uno, y cada punto representa el promedio  $\pm$  DE. Los asteriscos indican significancia entre los grupos al día 14 post-infección. \*\*:  $p < 0,001$ , ns: no significativo, calculado por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni. PTM: Pentamidina 4 mg/kg; BNZ5: Benznidazol 5 mg/kg; BNZ5+PTM: Benznidazol 5 mg/kg asociado a Pentamidina; BNZ20: Benznidazol 20 mg/kg; BNZ20+PTM: Benznidazol 20 mg/kg asociado a Pentamidina.

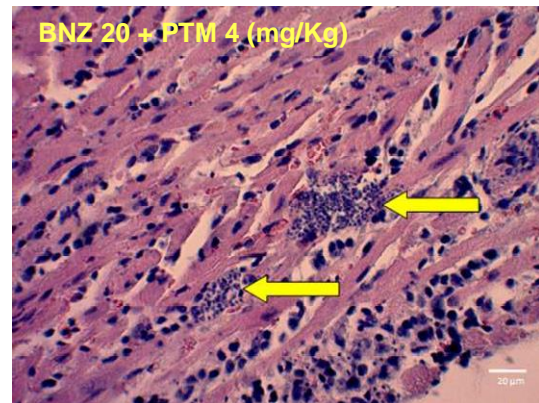
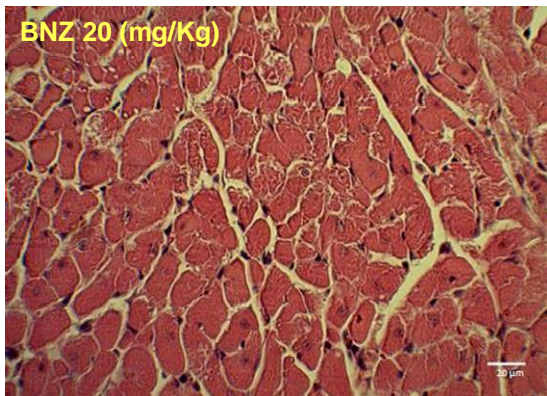
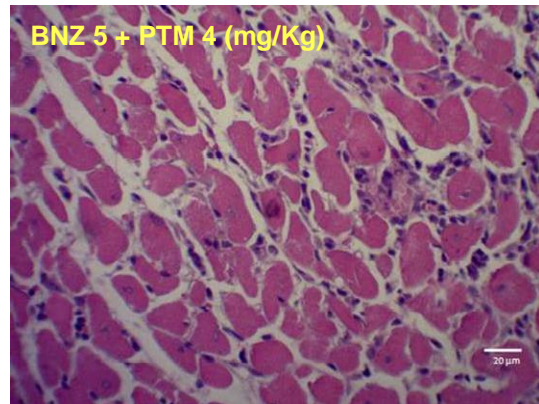
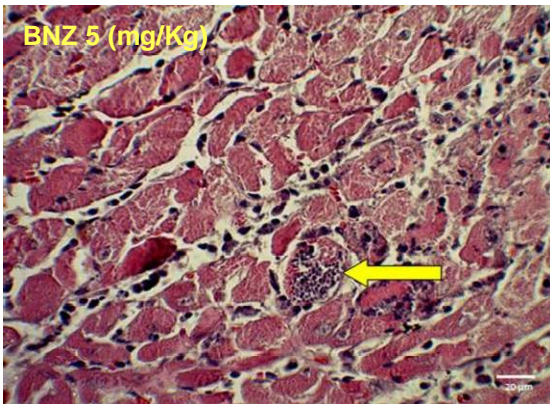
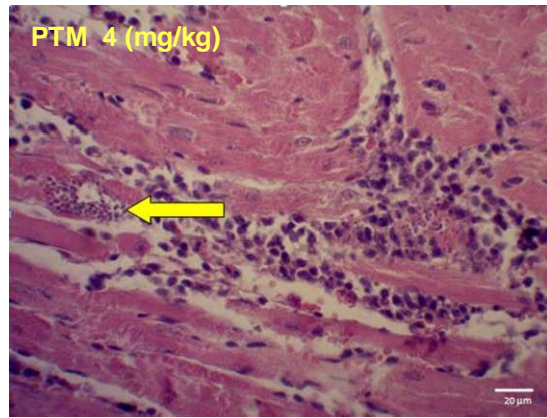
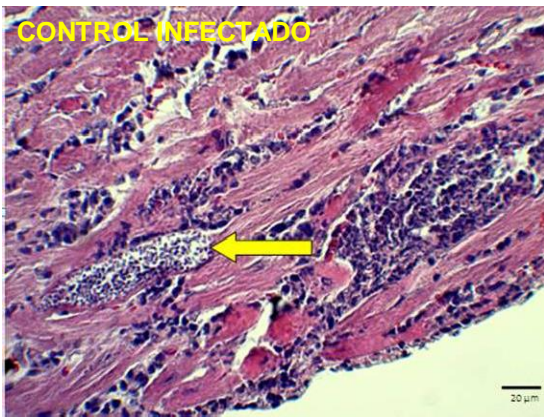
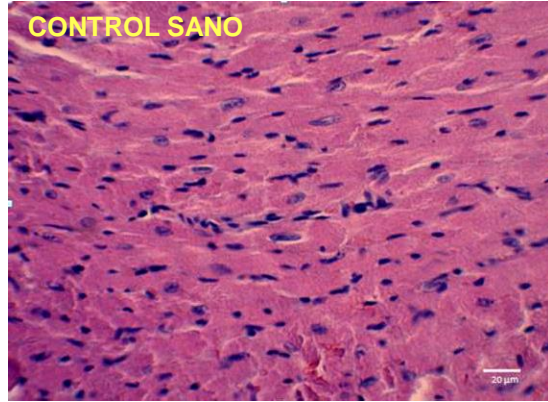
### **Pentamidina no modifica el efecto de Benznidazol en la carga parasitaria en corazones de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi***

Por otra parte, se realizó análisis histopatológico del tejido cardíaco (Figura 13), donde, luego de obtener microfotografías de los cortes fijados y teñidos con hematoxilina-eosina, se contabilizó la cantidad de nidos de amastigotes y del infiltrado inflamatorio. En la cuantificación de nidos de amastigotes, se aprecia que las medianas de cada grupo tratado (BNZ20 y BNZ5) son significativamente menores que el grupo control infectado, y que la adición de PTM a BNZ5 produjo una leve reversión, no significativa, de este efecto y no modificando el efecto de BNZ20. Estadísticamente, el tratamiento combinado de PTM y BNZ a dosis baja no es diferente al control sin tratamiento. Además, se realizó el estudio de carga parasitaria mediante cuantificación por qPCR, obteniendo que PTM no modifica el efecto de BNZ5 ni BNZ20 (figura 14).

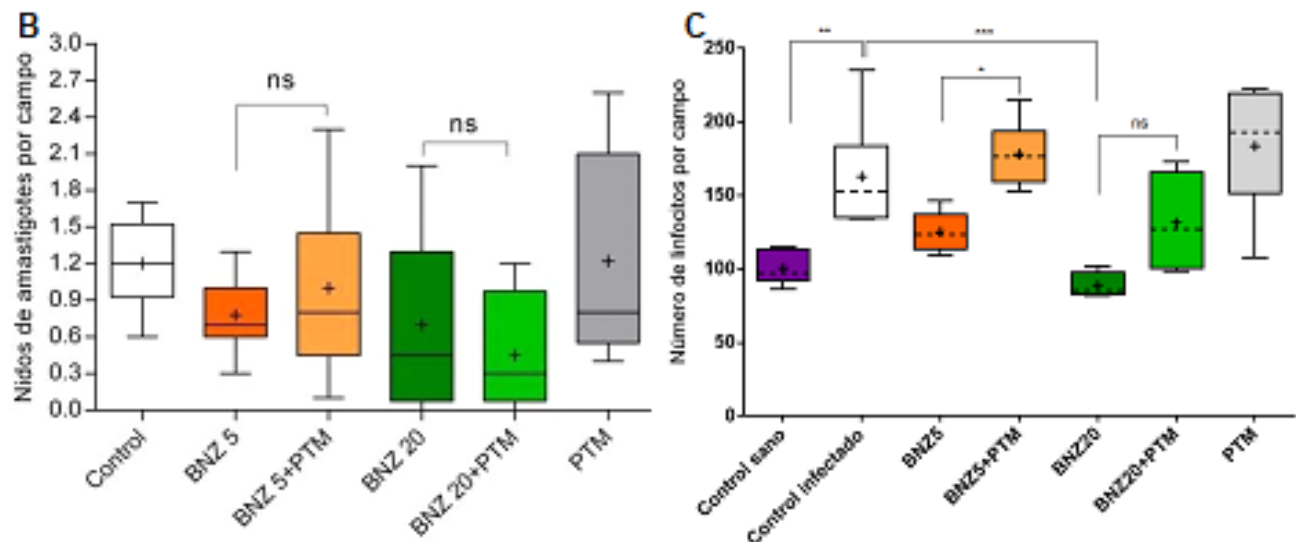
### **Pentamidina asociada a Benznidazol a dosis baja aumenta la inflamación en corazones de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi***

En relación a la cuantificación de la infiltración inflamatoria, se observa un aumento en la cantidad de linfocitos por campo en los grupos con PTM (sólo o asociado), comportándose de manera similar al control infectado. Mientras que los grupos con BNZ (5 y 20 mg/kg) sin asociar se comportan de manera similar al grupo control sano (Figura 13C).

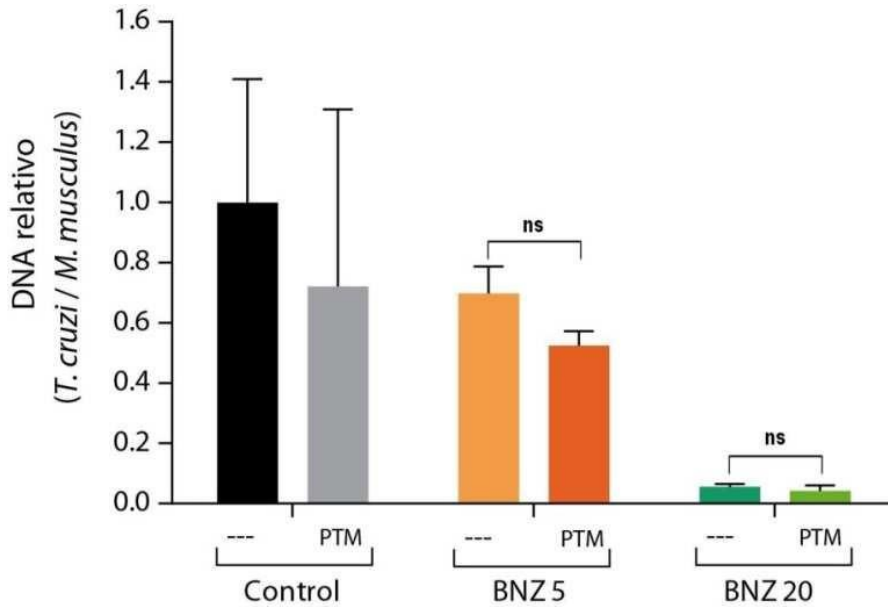
A







**Figura 13.- Análisis histopatológico de la carga parasitaria e infiltrado inflamatorio en tejido cardíaco en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (cepa Y) y tratados con PTM (4 mg/kg), BNZ (5 o 20 mg/kg) y sus combinaciones.** (A) Microfotografías representativas de cortes de corazón teñidas con hematoxilina-eosina de ratones sanos, infectados con y sin tratamiento. Muestras obtenidas de ratones moribundos o sobrevivientes al día 18 post-infección. Las flechas amarillas indican nidos de amastigotes. Las imágenes son representativas de por lo menos 5 ratones de cada grupo. (B) Cuantificación de nidos de amastigote presentes en corazones de ratones infectados. (C) Cuantificación de infiltración inflamatoria (linfocitos) en corazones de ratones sanos e infectados. Los gráficos muestran la media (+), mediana (línea discontinua), intervalo de confianza de 95% (caja) y desviación estándar de por lo menos 4 ratones por grupo de 2 experimentos independientes. ns: no hay diferencia significativa entre los grupos; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$  y \*\*\*:  $p < 0,001$ , calculado por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni. PTM: Pentamidina 4 mg/kg; BNZ5: Benznidazol 5 mg/kg; BNZ5+PTM: Benznidazol 5 mg/kg asociado a Pentamidina; BNZ20: Benznidazol 20 mg/kg; BNZ20+PTM: Benznidazol 20 mg/kg asociado a Pentamidina



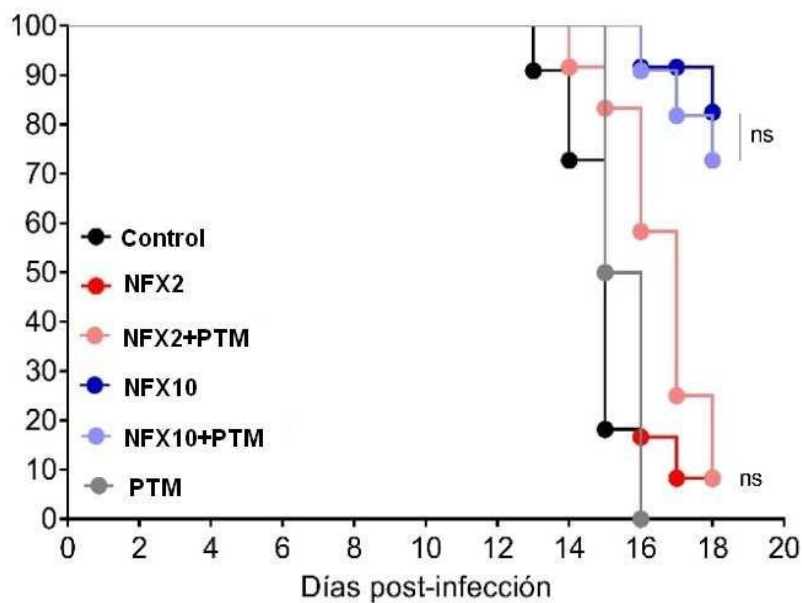
**Figura 14.- Análisis por qPCR de la carga parasitaria en tejido cardíaco en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (cepa Y) y tratados con PTM (4 mg/kg), BNZ (5 o 20 mg/kg) y sus combinaciones.** Los corazones fueron obtenidos de ratones moribundos o sobrevivientes al día 18 post-infección. Gráfico representa el promedio  $\pm$  DE de a lo menos 6 ratones por grupo. ns: no hay diferencia significativa entre los grupos, calculado por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni. PTM: Pentamidina 4 mg/kg; BNZ5: Benznidazol 5 mg/kg; BNZ5+PTM: Benznidazol 5 mg/kg asociado a Pentamidina; BNZ20: Benznidazol 20 mg/kg; BNZ20+PTM: Benznidazol 20 mg/kg asociado a Pentamidina.

## **Efecto de Pentamidina sobre el tratamiento con Nifurtimox en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi***

Se infectaron ratones BALB/c con tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) por vía intraperitoneal. Los tratamientos se realizaron por 15 días iniciando el día 2 post-infección. NFX se administró por vía oral en agua de bebida, usando dos dosis: 2 y 10 mg/kg/día. PTM (4 mg/kg/día) se administró por vía intraperitoneal. Ambos tratamientos se realizaron por 15 días. La eficacia del tratamiento fue seguida a través de la obtención de tasa de supervivencia y presencia de parásitos en sangre y en tejido cardíaco.

## Pentamidina no modifica el efecto de Nifurtimox en la sobrevida de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*

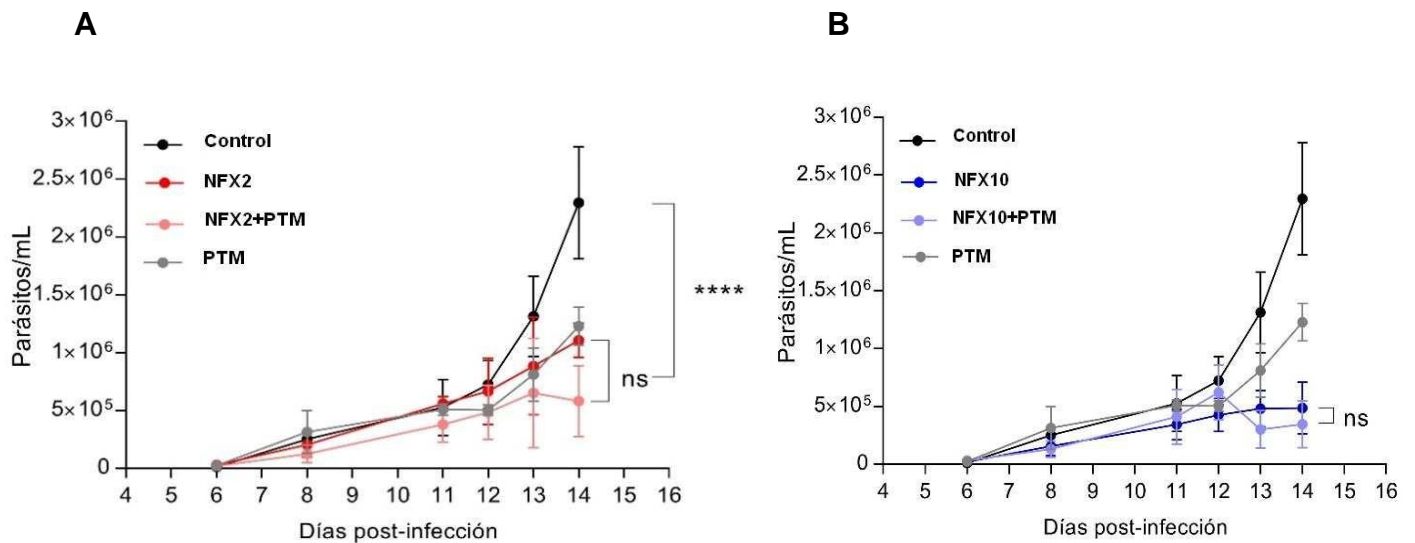
En relación a sobrevida (Figura 15), no se presentaron diferencias entre los grupos NFX 2 mg/kg/día (NFX2) y NFX2+PTM ni con el control infectado (sobrevida media: 15,5, 17 y 15 días, respectivamente). De la misma manera, no hubo cambios entre los grupos tratados con NFX 10 mg/kg/día (NFX10) y NFX10 + PTM 4 mg/kg/día.



**Figura 15.- Tasa de sobrevida de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (cepa Y) y tratados con PTM (4 mg/kg), NFX (2 o 10 mg/kg) y sus combinaciones.** La sobrevida fue evaluada diariamente hasta el día 18 post- infección. Gráfico resume dos experimentos independientes con n=6 cada uno. La comparación estadística entre grupos se calculó con la prueba log-rank (Mantel Cox). ns: no significativo. PTM: Pentamidina 4 mg/kg; NFX2: Nifurtimox 2 mg/kg; NFX2+PTM: Nifurtimox 2 mg/kg asociado a Pentamidina; NFX10: Nifurtimox 10 mg/kg; NFX10+PTM: Nifurtimox 10 mg/kg asociado a Pentamidina.

## Pentamidina no modifica el efecto de Nifurtimox en la parasitemia de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*

Con respecto a parasitemia, se observa una diferencia significativa favorable para el tratamiento con NFX2, tanto sólo como asociado respecto al control. Sin embargo, entre ambos tratamientos la diferencia es no significativa. En cuanto a los grupos NFX10 y NFX10+PTM, éstos no presentan diferencia, lo que podría indicar que el efecto se debe principalmente a NFX (Figura 16).



**Figura 16.- Efecto en la parasitemia en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (cepa Y) y tratados con PTM (4mg/kg), NFX (2 o 10 mg/kg) y sus combinaciones.**

(A) Parasitemia en ratones infectados y tratados con PTM, NFX2 y sus combinaciones.

(B) Parasitemia de ratones infectados y tratados con PTM, NFX10 y sus combinaciones.

Gráfico resume 2 experimentos independientes con n=6 cada uno. Barras representan desviación estándar de los promedios. Asteriscos indican significancia entre los grupos al día 14 post- infección. ns: no significativo; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ , calculado por ANOVA de ds vías y post-test de Bonferroni. PTM: Pentamidina 4 mg/kg; NFX2: Nifurtimox 2 mg/kg; NFX2+PTM: Nifurtimox 2 mg/kg asociado a Pentamidina; NFX10: Nifurtimox 10 mg/kg; NFX10+PTM: Nifurtimox 10 mg/kg asociado a Pentamidina.



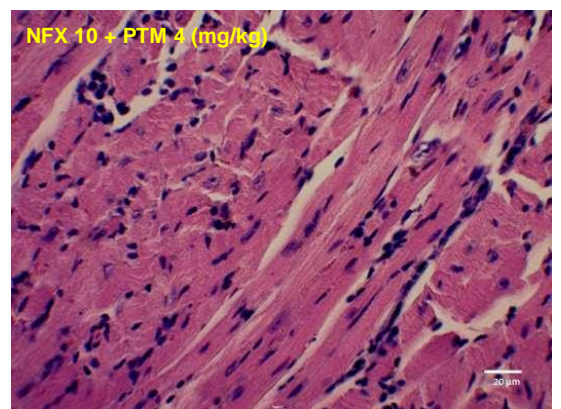
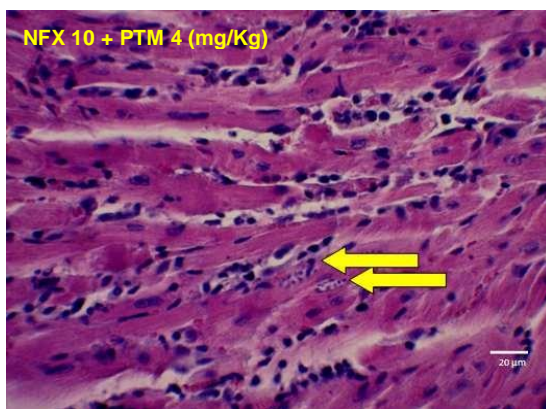
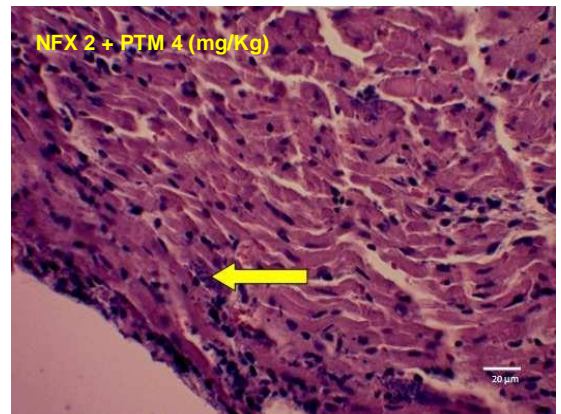
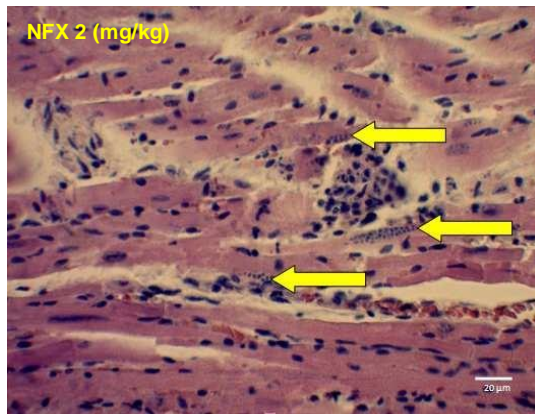
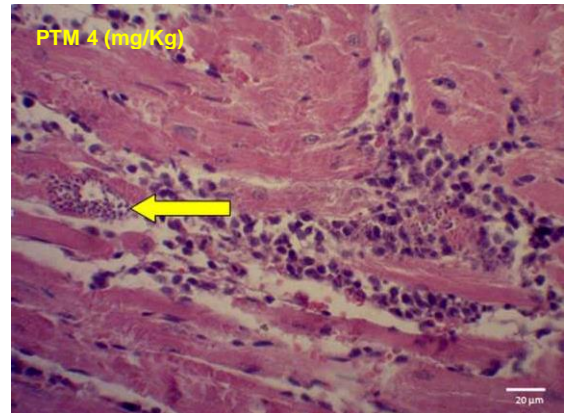
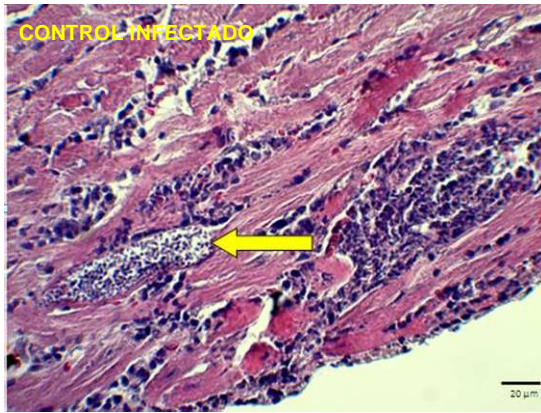
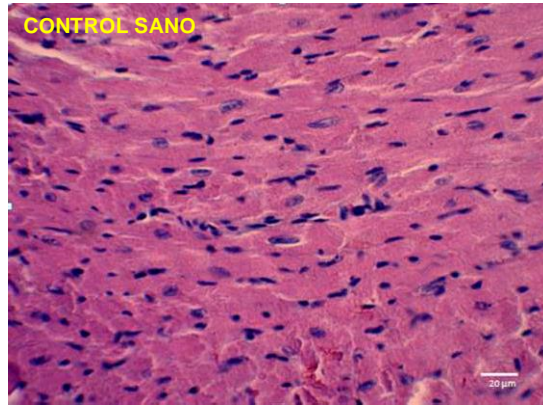
### **Pentamidina no modifica el efecto de Nifurtimox en la carga parasitaria en corazones de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi***

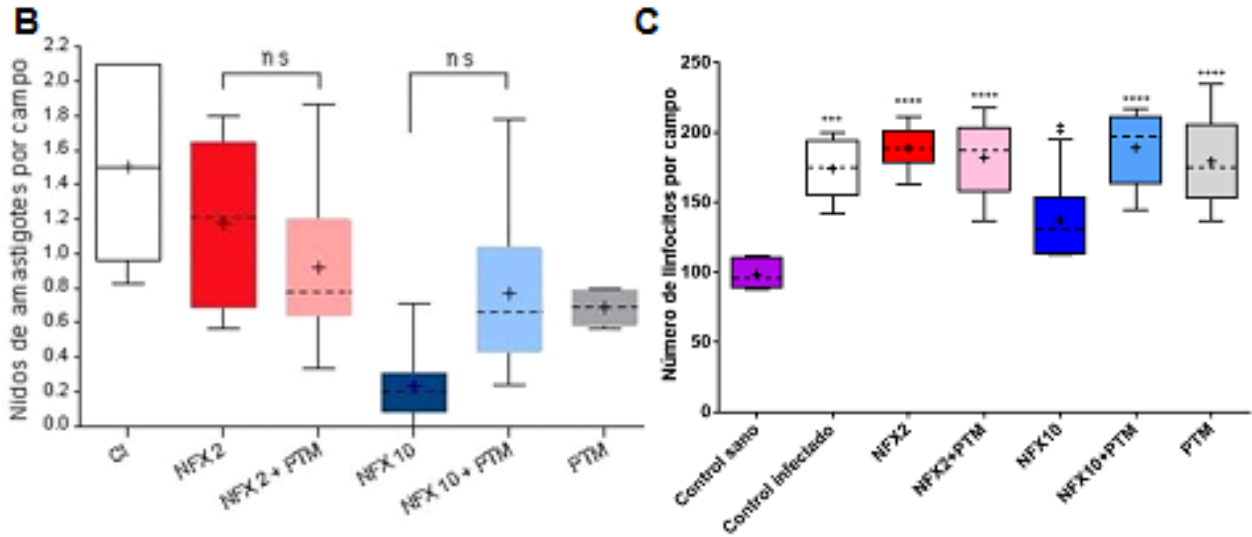
En relación a la carga parasitaria en tejido cardíaco (Figura 17), tampoco se apreciaron diferencias significativas entre NFX y PTM, a dosis alta o baja de NFX, correspondiendo a lo obtenido mediante qPCR (Figura 18).

### **Pentamidina asociada a Nifurtimox a dosis alta aumenta la inflamación en corazones de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi***

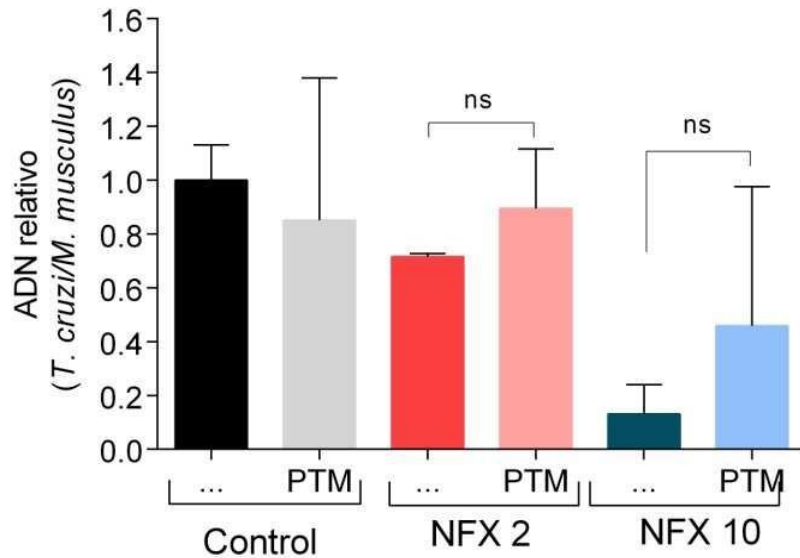
Además, se evaluó la infiltración inflamatoria en tejido cardíaco, donde se observó un aumento en el infiltrado en los grupos tratados con PTM, sólo observando disminución del infiltrado linfocitario en el grupo tratado con NFX10 (Figura 17C).

A





**Figura 17.- Análisis histopatológico de la carga parasitaria e infiltrado inflamatorio en tejido cardíaco en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (cepa Y) y tratados con PTM (4mg/kg), NFX (2 o 10 mg/kg) y sus combinaciones.** (A) Microfotografías representativas de cortes de corazón teñidas con hematoxilina-eosina de ratones sanos, infectados con y sin tratamiento. Muestras obtenidas de ratones moribundos o sobrevivientes al día 18 post-infección. Las flechas amarillas indican nidos de amastigotes. Las imágenes son representativas de por lo menos 5 ratones de cada grupo. (B) Cuantificación de nidos de amastigotes presentes en corazones de ratones infectados. (C) Cuantificación de infiltración inflamatoria (linfocitos) en corazones de ratones sanos e infectados. Los gráficos muestran la media (+), mediana (línea discontinua), intervalo de confianza de 95% (caja) y desviación estándar (barras) de por lo menos 4 ratones por grupo de 2 experimentos independientes. ns: no hay diferencia significativa entre los grupos. \*\*\*  $p < 0,001$  y \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs control sano; ‡  $p < 0,05$  vs NFX10+PTM, calculado por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni. PTM: Pentamidina 4 mg/kg; NFX: Nifurtimox 2 mg/kg; NFX2+PTM: Nifurtimox 2 mg/kg asociado a Pentamidina; NFX10: Nifurtimox 10 mg/kg; NFX10+PTM: Nifurtimox 10 mg/kg asociado a Pentamidina.



**Figura 18.- Análisis por qPCR de la carga parasitaria en tejido cardíaco en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (cepa Y) y tratados con PTM (4 mg/kg), NFX (2 o 10 mg/kg) y sus combinaciones.** Los corazones fueron obtenidos de ratones moribundos o sobrevivientes al día 18 post-infección. Gráfico representa media  $\pm$  desviación estándar de a lo menos 6 ratones por grupo. ns: no hay diferencia significativa entre los grupos, calculado por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni. PTM: Pentamidina 4 mg/kg; NFX: Nifurtimox 2 mg/kg; NFX2+PTM: Nifurtimox 2 mg/kg asociado a Pentamidina; NFX10: Nifurtimox 10 mg/kg; NFX10+PTM: Nifurtimox 10 mg/kg asociado a Pentamidina.

## DISCUSIÓN

El tratamiento etiológico de la Enfermedad de Chagas se asocia frecuentemente a la presentación de reacciones adversas, ya sea usando BNZ o NFX, lo que conduce a suspensión de tratamiento y, por consiguiente, a fracaso terapéutico. Basados en esto, se buscan nuevas alternativas farmacológicas que permitan el tratamiento de la patología, disminuyendo la frecuencia de presentación de efectos adversos y mantención de tratamiento.

PTM es un fármaco que, al poco tiempo de su descubrimiento, fue descartado para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas por Yorke *et al* (1940), al no presentar actividad como antichagásico en un modelo de infección murino. Sin embargo, en estudios previos en nuestro laboratorio se observó una acción tripanocida tanto *in vitro* como *in vivo*. En el estudio *in vitro*, PTM disminuyó la viabilidad de tripomastigotes aislados de *T. cruzi* con una IC50 de 5  $\mu$ M y disminuyó la carga parasitaria en células cultivadas (VERO y RAW 264.7) a concentraciones entre 1 y 3  $\mu$ M, mientras que en un modelo *in vivo*, PTM (8 mg/kg/día) aumentó significativamente la supervivencia, disminuyendo el infiltrado leucocitario en tejido cardíaco y carga parasitaria en ratones infectados con *T. cruzi* (cepa Y). Aún más importante, PTM bloquea el transporte de poliaminas en tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi* (Díaz *et al*, 2014).

El mecanismo de acción de PTM no se encuentra totalmente dilucidado. Clásicamente, se relaciona a su capacidad de unión no específica a moléculas como ADN, ARN y nucleótidos, dado por la afinidad de cargas. En tripanosomátidos, esto ocurre fundamentalmente en el ADN del kinetoplasto, generando linearización y disrupción del ADN mitocondrial (Wilkinson y Kelly, 2009). Sin embargo, esta destrucción del kinetoplasto, no explica completamente su modo de acción, debido a que se ha demostrado que en parásitos sin kinetoplasto, generados artificialmente, mantienen su viabilidad (Schnauffer *et al*, 2002).

Se postula que la actividad de PTM proviene de su capacidad de bloquear el transportador de poliaminas, como fue observado en *Leishmania major* (LmPOT1), que permite el ingreso selectivo de putrescina y espermidina. Lo que avalaría su uso en *T. cruzi*, considerando la alta similitud en los transportadores entre ambas especies (Carrillo *et al*, 2006; Hasne *et al*, 2010). De hecho, tal como se mencionó anteriormente, en el estudio de Díaz *et al* (2014), PTM inhibió el transporte de putrescina por más del 80% en epimastigotes y en amastigotes. De igual forma, se inhibió el ingreso de espermidina, pero en menor medida.

En el presente estudio, no se observó modificación en la actividad antichagásica de BNZ ni NFX ante la presencia de PTM, incluso, se logró observar que en algunos casos hubo antagonismo al asociar los fármacos. Es así que se pudo observar un mayor número de parásitos circulantes en la combinación de BNZ a dosis baja con PTM, siendo significativamente diferentes que los tratamientos no asociados. Aunque no hubo modificación en la carga parasitaria en corazón, obtenida por análisis histopatológico y qPCR, siendo similares entre los tratamientos solo o asociado de BNZ a dosis baja, sí fue posible observar un efecto similar en un estudio *in vitro* realizado en paralelo a esta tesis, donde la carga parasitaria en células RAW 264.7 aumentó en presencia de la combinación BNZ a concentración efectiva asociada a PTM a concentraciones bajas que no generan efecto (Seguel *et al*, 2016).

Además, en dicho estudio también se evaluó la viabilidad de tripomastigotes obteniendo un comportamiento antagónico en concentraciones media-altas de BNZ asociado a concentraciones bajas de PTM. En el ensayo no se observó ningún punto sinérgico a distintas combinaciones de concentraciones. Este aumento de viabilidad en presencia de la asociación estaría en línea con el aumento en la parasitemia observada *in vivo* (Seguel *et al*, 2016).

Adicionalmente, se evaluó el efecto sobre el transportador TcPAT12 y el bloqueo por PTM como posible mecanismo de acción. Previamente, en el estudio de Díaz *et al* (2014), se observó que PTM disminuyó la concentración de putrescina y espermidina



de manera significativa. Mientras que en Seguel *et al* (2016), a pesar de observar esta disminución de putrescina en el parásito, no se obtuvo disminución de T(SH)<sub>2</sub>, lo que indicaría un mecanismo de acción diferente al propuesto inicialmente.

La estrategia de bloquear el metabolismo de poliaminas para aumentar el efecto de fármacos tripanocidas ha sido explorada también en un modelo de infección por *Trypanosoma brucei*. Vincent *et al* (2012), observaron falta de sinergismo entre NFX y eflornitina (un inhibidor de la síntesis de putrescina) en parásitos aislados de *Trypanosoma brucei*. Eflornitina disminuye la síntesis de T(SH)<sub>2</sub> al unirse de forma irreversible a ornitina decarboxilasa, produciendo un efecto similar al propuesto por PTM en este trabajo, al tratar de disminuir la síntesis de T(SH)<sub>2</sub>. Se debe considerar que la combinación NFX y eflornitina es el tratamiento recomendado por la OMS para tripanosomiasis africana. En ese sentido, nuestros datos concuerdan que la sola inhibición del metabolismo de poliaminas no pareciera ser suficiente para producir una reducción letal de los niveles de T(SH)<sub>2</sub>.

Estudios recientes mencionan la presencia de 6 transportadores de poliaminas (incluyendo TcPAT12), que aún están siendo revisados y que permitirían el ingreso de otras poliaminas (espermina o espermidina) (Reigada *et al*, 2016). Es sabido que funciones esenciales para la vida de los organismos tienen mecanismos redundantes, los que estarían, en este caso, favoreciendo la mantención de los niveles de tripanotión.

Por otra parte, se ha estudiado inhibir el metabolismo de T(SH)<sub>2</sub> a través del bloqueo de la síntesis de glutatión del parásito. En ese sentido, la inhibición de la síntesis de glutatión por inhibición de su enzima marcapaso, ha demostrado disminuir los niveles de T(SH)<sub>2</sub>, aumentando la actividad de NFX y BNZ *in vitro*. Sin embargo, a la fecha no existen inhibidores específicos de la enzima del parásito, por lo que esta estrategia no ha sido fructífera en modelos preclínicos (Faúndez *et al*, 2005; Faúndez *et al*, 2008).

En relación a los resultados obtenidos de la infiltración inflamatoria en tejido cardiaco, esto no concuerda con otros estudios que ligan a PTM con un efecto antiinflamatorio en diversos tejidos (pulmón, colon), donde se demuestran diversas vías de modulación inflamatoria al inhibir la actividad, e incluso llevando a la apoptosis, de macrófagos. Ante esto, es necesario un mayor análisis de la asociación farmacológica que podría llevar a mayor daño inflamatorio en el tejido al encontrarse asociado a BNZ (Luster y Rosenthal, 1993; Esposito *et al*, 2012).



## CONCLUSIÓN

**Pentamidina a 4 mg/kg/día no modifica la actividad antichagásica de Benznidazol o Nifurtimox en un modelo *in vivo* de infección aguda por *Trypanosoma cruzi*.**

## BIBLIOGRAFÍA

- Algranati I. D. (2010) Polyamine metabolism in *Trypanosoma cruzi*: studies on the expression and regulation of heterologous genes involved in polyamine biosynthesis. *Amino Acids* 38: 645 – 651.
- Apt W. (1999) Tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Parasitol. Día* 23, n. 3-4: pp.100-112
- Apt W., Heitmann I., Jercic MI., Jofré L., Muñoz P., Noemí I., San Martín A., Sapunar J., Torres M., Zulantay I. (2008) Guías clínicas de la enfermedad de Chagas 2006: Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. *Rev. chil. infectol.* v.25 n.5.
- Atías, A., Apt, W. (1991) Enfermedad de Chagas. En: *Parasitología Clínica*. 3ª edición. Ed. Mediterráneo. Santiago pp. 255-268.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M. (2004) A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 01(7):2034-2039
- Babokhov P, Sanyaolu AO, Oyibo WA, Fagbenro-Beyioku AF, Iriemenam NC. (2013) A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. *Pathog Glob Health.* 107(5):242-52.
- Botero, D, Restrepo, P. (1992) *Parasitosis Humanas*. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia. pp 191 – 206.
- Cardoso MS, Reis-Cunha JL and Bartholomeu DC (2016) Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Front. Immunol.* 6:659.
- Carrillo, C., Canepa, G. E., Algranati, I. D. and Pereira, C. A. (2006) Molecular and functional characterization of a spermidine transporter (TcPAT12) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 936–940.
- Chagas C. (1909) Nova tripanossomiase humana: Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do *Schizo-trypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1: 159-218.

- Coura JR, de Castro S. A. (2002) Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.97 no.1
- Coura JR; Viñas PA. (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature 24 junio 2010, 56-57.
- de Souza W1, de Carvalho TM, Barrias ES. (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. Int J Cell Biol. 2010
- Díaz MV., Miranda M., Campos-Estrada C., Reigada C., Maya JD., Pereira C, López-Muñoz R. (2014) Pentamidine exerts in vitro and in vivo anti *Trypanosoma cruzi* activity and inhibits the polyamine transport in *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica 134, 1–9.
- Dvorak, J.A., Hyde, T.P. (1973) *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. I. Individual interactions and the cellular and subcellular levels. Exp. Parasitol. 34, 268–283.
- Edwards KJ, Jenkins TC, Neidle S. (1992) Crystal structure of a pentamidine-oligonucleotide complex: implications for DNA-binding properties. Biochemistry 11; 31(31):7104-9.
- Esposito G, Capoccia E, Sarnelli G, Scuderi C, Cirillo C, Cuomo R, Steardo L. (2012) The antiprotozoal drug pentamidine ameliorates experimentally induced colitis in mice. J Neuroinflammation 9:277.
- Faúndez M., Pino L., Letelier P., Ortiz C., López R., Seguel C., Ferreira J., Pavani M., Morello A., Maya JD. (2005) Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother 49 (1): 126-130.
- Faúndez M., López-Muñoz R., Torres G., Morello A., Ferreira J., Kemmerling U., Orellana M., Maya JD. (2008) Buthionine sulfoximine has anti-*Trypanosoma cruzi* activity in a murine model of acute Chagas disease and enhances the efficacy of nifurtimox. Antimicrob Agents Chemother 52, 1837- 9
- Filardi L.S., Brener Z. (1987) Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81, 755-759.

- Gorla, N.B.; Ledesma, O.S.; Barbieri, G.P., Larripa, I.B. (1989) Thirteen fold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutation Res.* 224:263-267.
- Hall BS, Bot C, Wilkinson SR. (2011) Nifurtimox Activation by Trypanosomal Type I Nitroreductases Generates Cytotoxic Nitrile Metabolites. *J Biol Chem.* 286(15):13088–13095.
- Hall BS, Wilkinson SR. (2012) Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 56 (1) 115–123.
- Hasne MP, Coppens I, Soysa R, Ullman B. (2010) A high-affinity putrescine-cadaverine transporter from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol.* 76(1): 78-91
- Hasne, M. P., Ullman, B. (2005) Identification and characterization of a polyamine permease from the protozoan parasite *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* 280, 15188–15194.
- Heby O, Roberts SC, Ullman B. (2003) Polyamine biosynthetic enzymes as drug targets in parasitic protozoa. *Biochem Soc Trans.* 31(2):415-9.
- Herwaldt BL. (2001) Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev.* 14(4):659-88.
- Kemmerling U., Bosco C., Galanti N. (2010) Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas disease: A proposal. *Biol. Res.* v.43 n.3.
- Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. (2013) Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis.* 13(4):342-8
- Livak K., Schmittgen T. (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 25, 402-406.
- Luna KP, Hernández IP, Rueda CM, Zorro MM, Croft SL, Escobar P. (2009) *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. *Biomedica.* 29(3):448-55.
- Luster M, Rosenthal G. (1993) Chemical agents and the immune response. *Environ Health Perspect* 100, 219-226.

- MINSAL (2011) Circular de vigilancia de enfermedad de Chagas (CIE 10: B57, P00.2 y Z22.8). Departamento de Epidemiología, MINSAL, Gobierno de Chile. Disponible en: <http://epi.minsal.cl/epi/html/normas/circul/Circular-Chagas.pdf>
- MINSAL (2015) Enfermedad de Chagas (CIE10: B57.0-B57.5; Z22.8; YP00.2) Situación epidemiológica, Enero-Diciembre 2014. Boletín Epidemiológico Trimestral, Vol. 111, nº 1.
- Müller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL. (2003) Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. Trends Parasitol. 19 (7): 320–328.
- OMS (2002) Serie de Informes Técnicos 905, Control de la enfermedad de Chagas. Segundo informe del comité de expertos de la OMS, Ginebra. 117p.
- OMS (2012) Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and Leishmaniasis. Technical report series N° 975.
- OMS (2015) Enfermedad de Chagas. Datos, mapas y estadísticas de OPS/OMS. Mapa Transmisión vectorial (2014). Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743)
- OMS (2016) La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana). Nota descriptiva N° 340 de Marzo de 2016. Disponible en la página: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
- Parker E, Sethi A. (2011) Chagas disease: coming to a place near you. Derm clin, 29(1): 53-62.
- Pegg AE. (2009) Mammalian polyamine metabolism and function. IUBMB Life. 61(9):880-94.
- Pegg AE. (2014) The function of spermine. IUBMB Life 66(1):8-18.
- Peluffo G, Piacenza L, Irigoín F, Alvarez MN, Radi R. (2004) L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. Trends Parasitol 20(8):363-9.
- Pudukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. (2007) Clinical aspects of the Chagas' heart disease. Int J Cardiol. 115(3):279-83.

- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. (2009) Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104 Suppl 1:152-8.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. (2010) Chagas disease. Lancet. 17; 375(9723):1388-402.
- Rassi A. Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. (2012) American trypanosomiasis (Chagas disease). Infect Dis Clin North Am. 2012 Jun; 26 (2):275-91
- Reigada C, Sayé M, Vera E, Balcazar D, Fraccaroli L, Carrillo C, Miranda M, Pereira C. (2016) *Trypanosoma cruzi* polyamine transporter: its role on parasite growth and survival under stress conditions. J Membrane Biol 249 (4), 475-481.
- Sanderson L., Dogruel M., Rodgers J., De Koning HP, Thomas SA. (2009) Pentamidine movement across the murine blood-brain and bloodcerebrospinal fluid barriers: effect of trypanosome infection, combination therapy, P-glycoprotein, and multidrug resistance-associated protein. J Pharm Exp Ther 329, 967-977.
- Schnauffer A, Domingo G, Stuart K. (2002) Natural and induced dyskinetoplastic trypanosomatids: how to live without mitochondrial DNA. Int J Parasitol 32, 1071-1084.
- Schoenbach EB, Greenspan EM. (1948) The pharmacology, mode of action and therapeutic potentialities of stilbamidine, pentamidine, propamidine and other aromatic diamidines—a review. Medicine (Baltimore). 27:327-77.
- Seguel V., Castro L., Reigada C., Cortés L., Díaz MV, Miranda M., Pereira C., Lapier M., Campos-Estrada C., Morello A., Kemmerling U., Maya JD., López-Muñoz R. (2016) Pentamidine antagonizes the benznidazole's effect *in vitro*, and lacks of synergy *in vivo*: Implications about the polyamine transport as an anti-*Trypanosoma cruzi* target. Exp Parasitol 171; 23-32.
- Shapiro, T.A., Englund, P.T. (1990) Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87, 950-954.
- Toso A., Vial F., Galanti N. (2011) Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. Rev. méd. Chile vol.139 no.2.

- Vincent IM, Creek DJ, Burgess K, Woods DJ, Burchmore RJ, Barrett MP. (2012) Untargeted metabolomics reveals a lack of synergy between nifurtimox and eflornithine against *Trypanosoma brucei*. PLoS. Negl. Trop. Dis. 6(5):e1618
- Wilkinson SR, Kelly JM. (2009) Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. Expert Rev Mol Med.11:e31.
- Wilkinson SR., Bot C., Kelly JM., Hall BS. (2011) Trypanocidal activity of nitroaromatic drugs: Current treatments and future perspectives. Curr Top Med Chem 11(16):2072-84.
- Woster P. (2010) Antiprotozoal/Antiparasitic agents. En: Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery, and Development. 7° edición. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Pp. 565-602.
- Yacoub S, Mocumbi AO, Yacoub MH. (2008) Neglected tropical cardiomyopathies: I. Chagas disease. HEART, Vol: 94, Pages: 244-248.
- Yorke, W. (1940) Recent Work on the Chemotherapy of Protozoal Infections. Trans.R. Soc. Trop. Med. Hyg. 33.
- Zahoor A. Lafleur MV, Knight R, Loman H, Edwards D.I. (1987) DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. Biochem. Pharmacol. 36(19):3299- 3304.





## **PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS GENERADAS POR ESTA TESIS**

Artículo publicado:

Exp Parasitol 171 (2016); 23-32. Pentamidine antagonizes the benznidazole's effect in vitro, and lacks of synergy in vivo: Implications about the polyamine transport as an anti-Trypanosoma cruzi target. Seguel V., Castro L., Reigada C., Cortés L., Díaz MV, Miranda M., Pereira C., Lapier M., Campos-Estrada C., Morello A., Kemmerling U., Maya JD., López-Muñoz R.

Presentación de póster en congreso:

XXXVI Congreso anual de la Sociedad de Farmacología. 27 al 30 de noviembre 2014, Chillán, Chile. Pentamidina antagoniza el efecto de benznidazol en un modelo in vivo de infección por Trypanosoma cruzi. Seguel V., Campos-Estrada C., Liempi A., Castillo C., Sandoval A., Castro L., Cortés L., Kemmerling U., Maya JD., Lopez-Muñoz R. Libro de resúmenes página 87.