

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN COMO
ESTRATEGIA PARA POTENCIAR EL EFECTO DE DROGAS
ANTICHAGÁSICAS EN MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN FARMACOLOGÍA

MARIO ANTONIO FAÜNDEZ CÁCERES

Directores:

Prof. Antonio Morello Caste, Ph.D

Prof. Juan Diego Maya Arango, Ph.D

2007

Dedicatoria

A mi madre, que me ha sabido iluminar más allá de esta vida...

A mi abuela, quien siempre me ha instado a más...

A mi padre, por su apoyo desde siempre...

A mi hermano, quien la vida me lo ha dado como hermano y como mi mejor amigo...

A mis hermanas, quienes con su dulzura, me dan el aliento necesario...

A mis sobrinas, quienes están comenzando a vivir...

Agradecimientos

Quiero agradecer sinceramente a:

Dr. Antonio Morello, fuente impresionante de conocimientos y vivencias que fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo, gracias doctor, por brindarme su apoyo e invaluable ayuda académica durante esta tesis.

Dr. Juan Diego Maya, profesor y amigo, con orgullo puedo decir que fui tu dirigido y que pudimos compartir además de los logros experimentales, valiosas conversaciones tanto de ciencia como de vida que sin duda serán un pilar para el resto de mi vida. Muchas gracias maestro y amigo.

Dra. Yolanda Repetto, una gran persona que siempre estuvo dispuesta a darme su consejo tanto académico como personal.

Dr. Jorge Ferreira, quien ha sido un maestro y aporte crítico en el desarrollo de este trabajo, y quien siempre tuvo una palabra de apoyo acompañada de buen humor durante mi estadía en la facultad.

A los académicos de la comisión revisora de este trabajo, quienes con sus conocimientos y consejos me han guiado y ayudado durante todo el desarrollo de esta tesis.

Los Amigos son hermanos que uno elige, Lupín, amigo y hermano, muchas han sido estas aventuras en el laboratorio, sin duda esta amistad ha sido fundamental para el desarrollo de este trabajo, gracias Luposo por tu apoyo incondicional y los invaluable aportes científicos que sin duda realzan este trabajo.

A mis amigos que día a día han compartido esta aventura doctoral quienes con su amistad y alegría han hecho de la estadía en el laboratorio una experiencia maravillosa, muchas gracias Gloria, Alejandro, Claudia y Denis la "brigada veterinaria" porque su apoyo en todo momento fue muy importante para seguir adelante durante todo este tiempo.

A una amiga cuyo apoyo fue fundamental para mi trabajo, Ulrike, muchas gracias por tu ayuda, enseñanzas y por tu humor genial.

A Juan Rivas, Enrique Moraga y Jorge Leiva, por su apoyo técnico, anímico, y por su excelente disposición para facilitar mi trabajo en el laboratorio.

A Dos amigas que incondicionalmente me apoyaron durante la realización de este doctorado. Amigas, siempre sentí que estaban al lado mío, me enorgullece que la vida me las haya presentado, muchas gracias Catalina Cano y Paula Pizarro.

Quiero agradecer a mi maestra la Dra. María Eugenia Letelier, quien vio en mí, lo que intento ser ahora.

Y a los que han estado siempre, mi familia...

Mis hermanos Miguel, Ángela y Gloria, quienes llenan mi vida de alegría y motivación.

Mi querida abuelita, Blanca, quien me enseñó que todo es posible y como dice ella: que sólo de los valientes se cuentan historias... Gracias por tu amor.

Madre, a pesar de que ya partiste, siempre tu recuerdo y tus enseñanzas están conmigo, todo lo que soy y seré te lo debo a ti. Padre siempre has estado a mi lado siendo un cable a tierra en esta vida. Gracias, muchas gracias.

Este trabajo se llevó a cabo gracias a los proyectos FONDECYT 1061072 y Proyecto anillo ACT 29.

ABREVIATURAS

GSH:	Glutación reducido
GSSG:	Glutación oxidado
GSH-SP:	Glutathionil espermidina
T(SH) ₂ :	Tripanotión reducido
T(S) ₂ :	Tripanotión oxidado
BSO:	L-Butionina (S, R) Sulfoximina
Nx:	Nifurtimox, 4-[(5-nitrofurfurilideno) amino]- 3-metilomorfolino-1,1-dióxido.
Bz:	Benznidazol, N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida
DMSO:	Dimetilsulfóxido
HEPPS:	Acido N-2-hidroxietyl- piperazina- N'-3-propanosulfónico
EDTA:	Acido etilen-diamino-tetra-ácetico, sal trisódico
MTT:	Bromuro de (3-[4,5-dimetil tiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolin)
PMS:	Fenazina metosulfato
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
PBS:	Buffer fosfato salino, pH 7,4

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS ORIGINADAS DE ESTA TESIS

PUBLICACIONES:

Faundez M, Pino L, Letelier P, Ortiz C, Lopez R, Seguel C, Ferreira J, Pavani M, Morello A, Maya JD. Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jan;49(1):126-30.

Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vasquez P, Ferreira J, **Faundez M**, Galanti N, Ferreira A, Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007 Apr;146(4):601-20.

PRESENTACIONES A CONGRESOS:

CONGRESOS NACIONALES

Incremento de la toxicidad de nifurtimox y benznidazol por butionina sulfoximina en epimastigotes de varias cepas de *trypanosoma cruzi*". López R., **Faúndez M.**, Pino L., Letelier P., Ortiz C., Seguel C., Morello A. y Maya J.D. "

Trypanosoma cruzi. Incremento de la toxicidad de Nifurtimox y Benznidazol por Butionina Sulfoximina. **Mario Faúndez**, Rodrigo López, Claudia Seguel, Carla Ortiz, Yolanda Repetto, Antonio Morello y Juan Diego Maya. Sextas Jornadas de Actividad de Investigación en Ciencia y Tecnología: “Perspectivas y Desafíos en Investigación”. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Abril del 2005.

Potenciación de Drogas Antichagásicas. Estudios en Parásitos Aislados y Células Vero Infechadas con *Trypanosoma cruzi*. **Mario Faúndez**, Rodrigo López, Claudia Seguel, Carla Ortiz, Yolanda Repetto, Antonio Morello y Juan Diego Maya. IX Jornadas Anuales de Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso. Libro de resúmenes pág. 38. 28 de Mayo 2005. (Premio: Primera mención honrosa).

Potenciación de Drogas Antichagásicas. Estudio en Ratones Infechados con *Trypanosoma cruzi*. **Mario Faúndez**, Claudia Seguel, Alejandro Sepúlveda, Yolanda Repetto, Antonio Morello y Juan Diego Maya. Universidad de Chile, Facultad de Medicina, ICBM, Programa de Farmacología Molecular y Clínica. XXVII Reunión Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Santiago,, Chile, 17 a 18 de Noviembre de 2005. Libro de resúmenes, P-40.

Trypanosoma Cruzi: PCR-Real Time Como Herramienta Para Medir Infección y Efecto Tripanocida De Drogas En Cultivos Infechados. (*Trypanosoma cruzi*:

PCR-real time as a tool for infection detection and drug effects evaluation in infected cultures). López, R., Sepúlveda, A., **Faúndez, M.**, Torres, G., Kemmerling U., Morello A. y Maya JD. XXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Quilpue, V Región, Chile, Septiembre de 2006. “

CONGRESOS INTERNACIONALES

Potenciación de Drogas Antichagásicas. Estudios en *Trypanosoma cruzi* y en un modelo *in Vitro* de la enfermedad de Chagas. Maya JD. **Faúndez M.** López R. Seguel C., Ortiz C., Barrera Y., Repetto Y., Morello A., Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, 16-19 de Octubre., Mendoza, Argentina. Libro de Resúmenes P-99

Potenciación de Drogas Antichagásicas. Antichagasics Drugs Potentation. Morello A., Repetto Y., **Faúndez M.**, Maya JD. Congreso Argentino de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, 16-19 de Octubre., Mendoza, Argentina. Libro de Resúmenes M-50.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas constituye uno de los principales problemas en salud pública en América Latina. Las drogas disponibles en la actualidad para el tratamiento, Nifurtimox y Benznidazol no presentan una respuesta clínica satisfactoria.

El mecanismo de acción de estas drogas es mediante la generación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos. Al respecto, el Glutati6n (GSH) y su conjugado con espermidina, Tripanoti6n ($T(SH)_2$), constituyen los principales mecanismos de defensa antioxidante del par6sito.

L-Butionina-(S,R)-Sulfoximina (BSO) inhibe la sntesis de GSH y ($T(SH)_2$), y potencia el efecto tripanocida del Nifurtimox y Benznidazol en modelos *in vitro* de la enfermedad de Chagas. A dosis de 500 μ M de BSO se observa una disminuci6n de m6s de un 80% de tioles en todas las formas del par6sito.

En epimastigotes, BSO 500 μ M disminuy6 los ICK_{50} (dosis inhibitoria 50 para la constante de crecimiento) de Nifurtimox o Benznidazol en un 60%, resultado similar se observ6 al evaluar la viabilidad de los epimastigotes midiendo la reducci6n de MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromuro).

Al tratar tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con BSO 500 μ M y Nifurtimox se observ6 una disminuci6n del IC_{50} medido por la reducci6n de MTT de 7,68 μ M a

3,01 μM y al asociar Benznidazol con BSO 500 μM el IC_{50} disminuyó de 33,07 a 3,84 μM .

En células Vero infectadas con amastigotes, BSO 25 μM fue capaz de potenciar el efecto de Nifurtimox y Benznidazol. Nifurtimox a concentración de 0,5 μM , el índice endocítico (porcentaje de células infectadas multiplicado por el promedio de amastigotes intracelulares) disminuyó de 2.500 a 980 cuando se agregó BSO 25 μM . Un resultado similar se observó cuando se asoció Benznidazol con BSO 25 μM .

En ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*, el tratamiento sólo con BSO, no aumentó la sobrevivencia de los animales; no obstante a ello, se observa una disminución significativa de la parasitemia a la dosis de BSO 1000 $\mu\text{moles/Kg/día}$. Al asociar esta dosis de BSO con Nifurtimox o Benznidazol, no se observa un aumento en la sobrevivencia o una disminución significativa en las parasitemias.

Los resultados *in vitro*, indican que la potenciación de Nifurtimox o Benznidazol por BSO podría disminuir las dosis clínicas de ambas drogas y disminuir los efectos secundarios o la duración de la terapia, no obstante los resultados *in vivo* no se orientan en el mismo sentido.

SUMMARY

Chagas' disease is a major parasitic cause of death and hardship, especially in the poor regions of the developing world. The current drugs: Nifurtimox and Benznidazole, are unsatisfactory for treatment.

These drugs act through the formation of free radicals and/or electrophilic metabolites, and Glutathione and its spermidine conjugated, Trypanothione are the main antioxidant defense mechanisms of the parasite.

The Glutathione synthesis inhibition with L-Buthionine (*S,R*)-sulfoximine (BSO) increased Nifurtimox and Benznidazole toxicity against epimastigote, trypomastigote, and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. 500 μ M BSO decreased total glutathione-derived thiols by 70 to 80% in 48 h.

In epimastigotes, 500 μ M BSO decreased the concentration of Nifurtimox or Benznidazole needed to reduce the parasites's growth constant (ICK_{50}) by 60%. The survival of epimastigotes treated with Nifurtimox or Benznidazole, as measured by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) reduction, was significantly decreased by 500 μ M BSO.

Trypomastigotes treated with 500 μM BSO decreased the IC_{50} of Nifurtimox measured by MTT reduction, from 7.68 μM to 3.01 μM and that of Benznidazole from 33.07 to 3.84 μM .

In Vero cells infected with amastigotes, 25 μM BSO was able to potentiate the effect of Nifurtimox and Benznidazole. At 0.5 μM Nifurtimox, the endocytic index (percentage of infected Vero cells multiplied by the average number of intracellular amastigotes) decreased from 2,500 to 980 when 25 μM BSO was added. A similar result was observed with the Benznidazole-BSO combination.

In BALB/c mice infected with *Trypanosome cruzi*, the treatment with only BSO did not increase animals survival; however a significant decrease of parasitemias was observed, with a BSO dose of 1000 $\mu\text{mol/Kg/day}$. This dose associated with Nifurtimox or Benznidazole, do not show an increase in the survival rate or a decrease in the parasitemia.

In vitro results indicate that potentiation of Nifurtimox or Benznidazole by BSO could decrease the clinical dose of both drugs and decrease to the side effects or therapy length. However the *in vivo* results do not lead to the same conclusion.

INDICE GENERAL

Dedicatoria.....	II
Agradecimientos	III
ABREVIATURAS	VI
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS ORIGINADAS DE ESTA TESIS	VII
PUBLICACIONES:.....	VII
PRESENTACIONES A CONGRESOS:.....	VII
RESUMEN.....	X
SUMARY.....	XII
INDICE GENERAL	XIV
INDICE DE FIGURAS.....	XVII
INDICE DE TABLAS	XX
INTRODUCCIÓN.....	1
Antecedentes Históricos de la Enfermedad de Chagas	2
Ciclo biológico del <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Epidemiología:	6
Características de la Enfermedad de Chagas	7
Tratamiento de la enfermedad de Chagas	9
Mecanismo de acción del Nifurtimox y del Benznidazol.....	12
Metabolismo de tioles y defensa contra radicales libres	15
HIPOTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	30

OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS	32
I. MATERIALES	32
II. MÉTODOS	33
Células VERO:	33
<i>Trypanosoma cruzi</i> tripomastigotes:	34
Determinación de tioles:	34
Ensayos de Viabilidad:	35
Determinación de proteínas totales.	36
Índice endocítico.....	36
Ratones	38
Modelo de infección.....	38
Administración de drogas.....	38
Estudio de parasitemia	39
Estudios Histológicos:	40
Análisis estadístico	41
RESULTADOS.....	42
ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	42
Efecto de BSO sobre el contenido de tioles en <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
Determinación del efecto de Butionina Sulfoximina sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	44

Determinación del efecto de drogas antichagásicas y su asociación con BSO sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
Determinación del efecto de drogas antichagásicas y su asociación con BSO sobre la viabilidad de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
Efecto de Nifurtimox y Benznidazol y su asociación con BSO en células VERO infectadas con <i>Trypanosoma cruzi</i>	55
Sobrevida de tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Efecto de Nifurtimox, Benznidazol y su combinación con BSO.	64
ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	67
Efecto de BSO en ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i>	67
Efecto de Nifurtimox y su asociación con BSO sobre ratones BALB/c, infectados con <i>T. cruzi</i> , cepa DM28c.	71
Efecto de Benznidazol y su asociación con BSO sobre ratones BALB/c, infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> , cepa DM28c.	77
DISCUSIÓN	82
CONCLUSIONES	92
REFERENCIAS	94

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo biológico del <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Figura 2 Fármacos antichagásicos Nifurtimox y Benznidazol.....	11
Figura 3 Reducción de Nitrocompuestos, reciclaje redox	12
Figura 4 Glutati6n	18
Figura 5 Síntesis de Glutati6n y Tripanoti6n en <i>Trypanosoma cruzi</i> y su inhibici6n por Butionina Sulfoximina.....	19
Figura 6 Ciclo del gama-glutamilo	20
Figura 7 Tripanoti6n	27
Figura 8 Efecto de BSO sobre el contenido de tioles en <i>Typanosoma cruzi</i>	43
Figura 9 Efecto de BSO sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	45
Figura 10 Efecto de Nx, Bz y su asociaci6n con BSO sobre el crecimiento de epimastigotes de la cepa LQ	47
Figura 11 Efecto de Nx, Bz y su asociaci6n con BSO sobre el crecimiento de epimastigotes de la cepa MF.....	48
Figura 12 Efecto de Nx, Bz y su asociaci6n con BSO sobre el crecimiento de epimastigotes de la cepa Dm28c.	49
Figura 13 Efecto de Nx, Bz y su asociaci6n con BSO sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa LQ.	52
Figura 14 Efecto de Nx, Bz y su asociaci6n con BSO sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa MF.....	53

Figura 15 Efecto de Nx, Bz y su asociación con BSO sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa Dm28c.	54
Figura 16 Efecto de Nifurtimox y su asociación con BSO en células VERO infectadas con <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
Figura 17 Efecto Nx, Bz y su asociación con BSO sobre el índice endocítico en células VERO infectadas con la cepa MF de <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Figura 18 Efecto Nx, Bz y su asociación con BSO sobre el índice endocítico en células VERO infectadas con la cepa LQ de <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
Figura 19 Efecto Nx, Bz y su asociación con BSO sobre el índice endocítico en células VERO infectadas con la cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
Figura 20 Efecto Nx, Bz y su asociación con BSO sobre el índice endocítico en células VERO infectadas con la cepa Dm28c de <i>Trypanosoma cruzi</i>	63
Figura 21 Efecto Nx, Bz y su asociación con BSO sobre el la viabilidad de tripomastigotes de la cepa MF.	66
Figura 22 Efecto de BSO en ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Dm28c.	68
Figura 23 Efecto de BSO en miocardio de ratones BALB/C infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
Figura 24 Efecto de Nifurtimox sobre ratones BALB/C infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i>	72
Figura 25 Análisis de sobrevivencia de ratones BALB/C infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> y tratados con Nifurtimox asociado a BSO.	74

Figura 26 Efecto de Nifurtimox y su asociación con BSO sobre parasitemias en ratones infectados con <i>T. cruzi</i>	74
Figura 27 Efecto de NX su asociación con BSO sobre miocardio de ratones BALB/C infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i>	76
Figura 28 Efecto de Benznidazol sobre ratones BALB/c infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i>	78
Figura 29 Análisis de sobrevivencia de ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> y tratados con la asociación de Benznidazol mas BSO.....	79
Figura 30 Efecto de Bz su asociación con BSO sobre miocardio de ratones BALB/c infectados con <i>trypanosoma cruzi</i>	81

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Valores de IC ₅₀ para BSO sobre <i>T. cruzi</i>	46
Tabla 2 Valores IC ₅₀ para Nx, Bz y su asociación con BSO sobre <i>T. cruzi</i> .	50
Tabla 3 Valores IC ₅₀ para Nx, Bz y su asociación con BSO sobre <i>T. cruzi</i>	54
Tabla 4 Valores IC ₅₀ para Nx, Bz y su asociación con BSO sobre <i>T. cruzi</i> en células VERO infectadas.....	63
Tabla 5 Efecto citotóxico de Nifurtimox y su asociación con BSO sobre tripomastigotes de la cepa MF.	65
Tabla 6 Efecto citotóxico de Benznidazol y su asociación con BSO sobre tripomastigotes de la cepa MF.	65

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es la condición clínica derivada de la infección por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, un parásito perteneciente a la clase kinetoplastida.

Esta enfermedad compromete órganos del sistema linforreticular, sistema nervioso central, miocardio y órganos huecos. Puede presentar tres fases clínicas generales; fase aguda, de latencia y crónica (Atías, 1998).

La fase aguda de esta enfermedad comienza, independiente de la forma de contagio, inmediatamente después de la infección. Este estado puede durar semanas o meses y es típicamente asintomático o asociado a fiebre u otras manifestaciones no específicas, sin embargo puede presentarse miocarditis aguda o meningoencefalitis, particularmente en niños y en pacientes inmunocomprometidos. La mortalidad en pacientes que presentan estos síntomas es cerca del 10% (Castro y cols., 2006).

Después de años o décadas de infección subclínica (fase de latencia), entre un 10 y un 50% de los pacientes que sobreviven a la fase aguda, desarrollan la denominada fase crónica de la enfermedad de Chagas que se caracteriza por

presentar cardiomiopatía, situación potencialmente letal, y/o megasíndromes (megaesófago y megacolon) (Castro y cols., 2006).

Respecto de lo anterior, es importante tomar en cuenta el tiempo que ha transcurrido desde que la infección fue adquirida, en este sentido, se considera una fase crónica temprana si la infección ocurrió durante los últimos diez años o en víctimas menores de 12 años y se considera una fase crónica tardía si el paciente presenta más de diez años de infección. Se ha descrito una mejor respuesta al tratamiento si este se realiza en la fase aguda o en la crónica temprana (Rodríguez-Coura y Castro, 2002).

Clínicamente, las drogas disponibles en la actualidad para el tratamiento no presentan una respuesta satisfactoria (Teixeira y cols., 2006).

Antecedentes Históricos de la Enfermedad de Chagas

En 1909, Carlos Chagas describió el agente etiológico de la enfermedad, un protozoo hemoflagelado al que denominó *Trypanosoma cruzi*, en honor a su maestro, el médico sanitarista Osvaldo Cruz. Además identificó algunos de los vectores y hospederos reservorios, junto con deducir correctamente la mayor parte del ciclo de transmisión de este parásito (Chagas, 1909). Así, el descubrimiento de esta parasitosis data desde comienzos del siglo pasado.

Por otra parte, existen antecedentes de que esta enfermedad esta presente desde hace mas de 9.000 años en el continente americano, pues se ha demostrado mediante PCR de fragmentos de DNA del kinetoplasto, la presencia de *Trypanosoma cruzi* en momias disecadas naturalmente encontradas en la costa y valle de la zona norte de Chile y sur del Perú (Aufderheide y cols. 2004).

Ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*

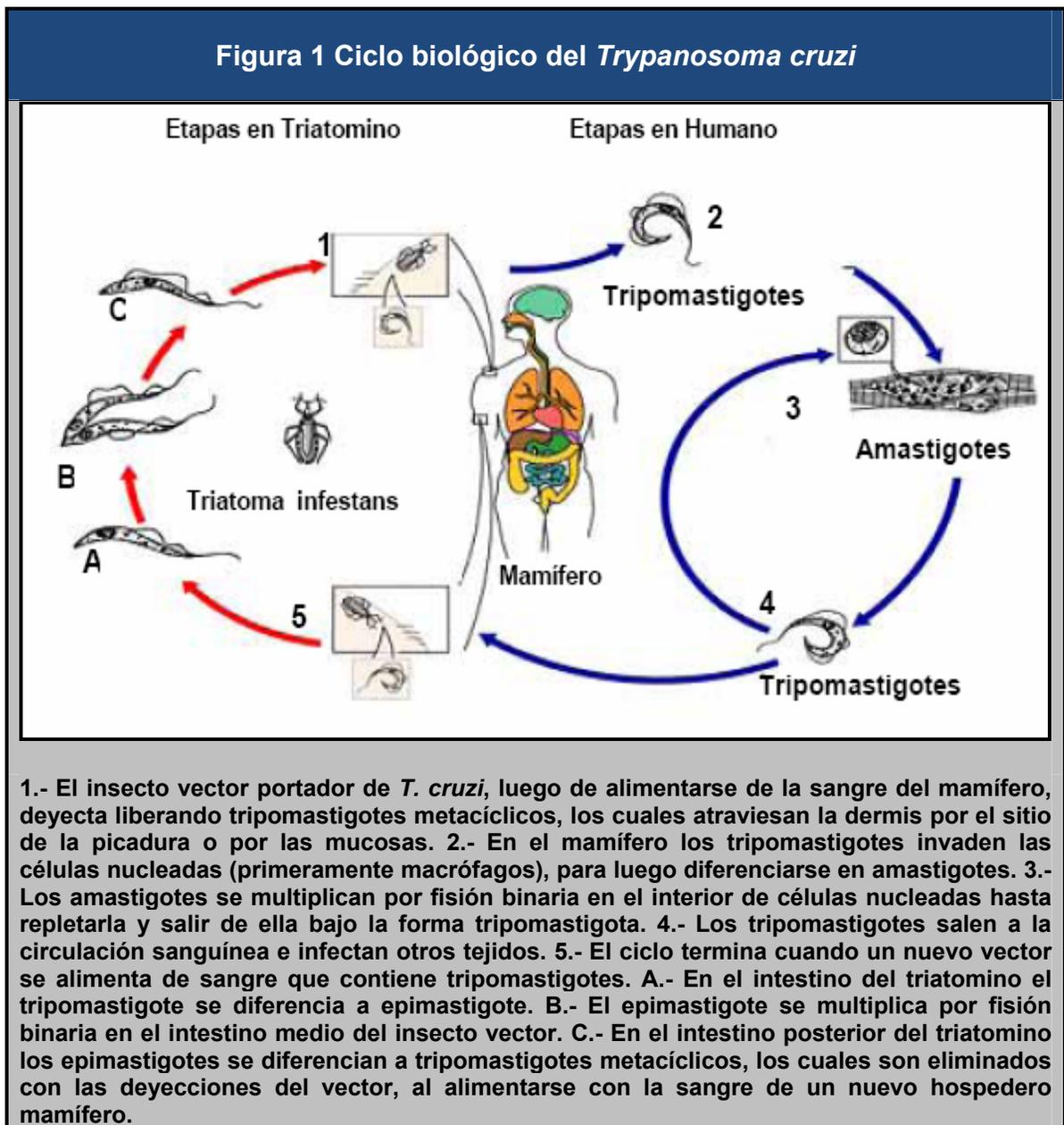
El complejo ciclo de vida del parásito se ilustra en la figura 1. Se puede observar que éste involucra necesariamente a un hospedero mamífero y a un insecto vector (triatominos hematófagos). La transmisión a mamíferos, incluido el hombre ocurre cuando las heces del triatomino que contienen la forma infectiva del parásito, tienen contacto con la picadura, mucosa o conjuntiva del mamífero. Luego de una multiplicación intracelular local del parásito, nuevas formas infectantes son liberadas desde la célula hospedera, la cual muere. Ahora estos parásitos son capaces de infectar otras células del organismo en lugares distantes de la primera infección. El ciclo se completa cuando un triatomino hematófago se alimenta de sangre que contiene formas infectantes del parásito. Evidentemente transfusiones sanguíneas desde pacientes infectados, implica la transmisión del parásito. Por otra parte, y en forma ocasional, los parásitos pueden ser transmitidos de la madre al feto resultando en un aborto espontáneo o en enfermedad de Chagas congénita, que en

algunas áreas puede presentarse del 2 al 5 % en infantes nacidos de madres infectadas. La transmisión oral de la infección por *Trypanosoma cruzi* no es común pero es posible, hecho que se ha demostrado con animales de laboratorio y por algunos casos documentados (Teixeira y cols., 2006). Finalmente este parásito se puede transmitir accidentalmente en laboratorios de investigación, pero su incidencia es prácticamente nula (Kirchhoff, 1993).

Lo anterior implica cambios morfológicos y fisiológicos en el parásito para poder adaptarse a las diferentes condiciones de los hospederos, ya sea en la célula, en la sangre del mamífero o el intestino del triatoma (Molyneux y Ashford, 1983). El ciclo biológico del parásito incluye tres estados morfológicos que se caracterizan por las posiciones relativas del flagelo, kinetoplasto y núcleo (Atías, 1998):

1. **Tripomastigote:** Mide 20 micrones, fusiforme, la posición del kinetoplasto es subterminal. Constituyen la forma infectante y se encuentran en la sangre de los mamíferos y en el intestino posterior de los triatomos. Carece de la capacidad de multiplicarse. En mamíferos, es el diseminador de la infección por vía sanguínea (Atías, 1998).
2. **Epimastigote:** Mide 20 micrones de largo, la posición del kinetoplasto es anterior al núcleo y es fusiforme. Representa la forma multiplicativa del parásito en el intestino del triatomino (Morello y cols., 1987; Atías, 1998).

3. **Amastigote:** Mide aproximadamente 2 micrones de diámetro, redondeados y de flagelo no emergente. Se multiplica por fisión binaria al interior de células nucleadas del hospedero mamífero, produciendo la ruptura de estas, liberando tripomastigotes a la sangre, los cuales infectarán nuevamente a otras células (Atías, 1998).



Epidemiología:

En términos de salud pública e impacto económico, se puede decir que la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, dada su alta morbilidad y mortalidad, es la infección parasitaria más importante en América Latina (Miles, 2003). En nuestro continente, esta patología es endémica y es después de la malaria la enfermedad ligada a vectores de mayor impacto (Atías, 1998., WHO, 2002., Rodríguez-Coura y Castro, 2002).

Se considera que existen al menos 100 millones de personas expuestas al riesgo de la infección lo que representa el 25% de la población latinoamericana (WHO, 2002), estimándose un total de 24,7 millones de casos, cifras a las que Chile contribuye con aproximadamente 350.000 casos presumiblemente infectados (Atías, 1998). Por otro lado, según lo reportado por la Organización Mundial de Salud, las tasas de mortalidad varían entre 8 y 12 % dependiendo del país estudiado, la edad, el estado fisiológico de los pacientes y la modalidad del tratamiento recibido (WHO, 2002).

El riesgo de contraer la enfermedad se relaciona en forma directa con la pobreza. Los insectos triatominos hematófagos encuentran un hábitat favorable en hendiduras de las paredes y techados de casas precariamente construidas en áreas rurales y barrios urbanos periféricos. Los movimientos migratorios hacia las zonas urbanas que ocurrieron en América Latina entre 1970 y 1980

cambiaron el modelo epidemiológico tradicional de la enfermedad de Chagas y la transformaron en una infección urbana que puede transmitirse por transfusión sanguínea. La sangre contaminada en algunos bancos de sangre urbanos oscila entre un 3,0 y un 53,0 % mostrando así que la cantidad de sangre infectada con *Trypanosoma cruzi* es mas alta que la infectada con VIH y Hepatitis B o C (WHO, 2002).

Características de la Enfermedad de Chagas

El *Trypanosoma cruzi* es transmitido por insectos del orden de los hemípteros, conocidos también como insectos besadores, dada su tendencia a picar en los labios y en la cara. En nuestro país el principal insecto vector es el *Triatoma infestans*, conocido comúnmente como Vinchuca (Cox, 2002).

Los principales vectores involucrados en la infección por *T. cruzi* son *Triatoma infestans* (Chile, Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú y Uruguay), *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius pallescens* (Colombia, Venezuela y Centro América), *Panstrongylus megitus*, *Triatoma brasillians* (Brasil). En Chile se reconocen dos especies de vectores de importancia epidemiológica en la transmisión de la enfermedad, *Triatoma infestans* involucrado en el ciclo domiciliario y *Mepraia spinolai* (*Triatoma spinolai*) involucrado en el ciclo silvestre (Canals y cols., 1999). También se describe

una nueva especie silvestre, *Mepraia gajardoi* (Frías y cols., 1998), pero aún no se conoce su importancia epidemiológica.

En Chile, la zona endémica comprende desde la primera a la sexta región, restringiéndose a zonas rurales, (Atias, 1998), siendo el principal vector el *Triatoma infestans*, cuyo hábitat se asocia a construcciones rurales, particularmente aquellas con paredes de barro y paja. No obstante, recientemente se han detectado ejemplares adultos del triatomino en viviendas rurales en la región metropolitana, con ausencia absoluta de estados ninfales, lo que sugiere focos extradomiciliarios de desarrollo de este vector (Bacigalupo y cols., 2006).

En el hombre, la infección se inicia en las capas dérmicas o mucosa conjuntiva por tripomastigotes metacíclicos (presentes en las heces del triatomino), capaces de infectar y de multiplicarse prácticamente dentro de cualquier célula nucleada. La infección intracelular tiene una duración de entre 3 a 5 días luego de los cuales los tripomastigotes infectivos son liberados dentro del torrente sanguíneo del hospedero, diseminando la infección. Por lo tanto, la capacidad de infectar y replicarse dentro de una gran variedad de células nucleadas es una característica esencial del ciclo biológico del *T. cruzi* en el mamífero (Burleigh, 2002).

En el estado post-agudo de la infección, los parásitos pueden ser indetectables en la mayoría de los tejidos y la parasitemia es bajísima, no obstante se puede detectar un nivel de persistencia, principalmente en el miocardio y en la musculatura lisa, lo que contribuye con el estado patológico asociado al estadio crónico de la enfermedad (Burleigh, 2002).

Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Las drogas actualmente utilizadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el Nifurtimox (4-[(5-nitrofurfurilideno)amino]-3-metiltiomorfolino-1,1-dióxido), derivado del nitrofurano y el Benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) derivado nitroimidazólico (Figura 2). El Nifurtimox ha sido el derivado 5-nitrofurfurilideno mas activo experimentalmente ensayado (Bock y cols., 1969); el Benznidazol demostró una alta actividad tripanocida tanto en ensayos *in vitro*, como en ensayos *in vivo* (Pollak, 1978). La dosis de Nifurtimox recomendada en la fase aguda de la enfermedad es de 8-10 mg/kg/día por 120 días en adultos y de 15 mg/kg/día en niños (Van Voorhis y cols., 1990); para el Benznidazol, 5 mg/kg/día por 60 - 90 días (Dictar y cols., 1998, Viotti y cols., 1994). La duración promedio de la terapia es 60 días, pero en casos de reactivación de la enfermedad crónica, como en pacientes inmunosuprimidos, la duración puede prolongarse hasta 5 meses o más. Sólo en infecciones accidentales, sea a través del vector, por transfusión de sangre

o por contaminación en el laboratorio, la duración del tratamiento es de 10-15 días.

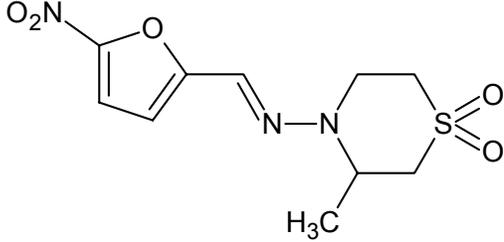
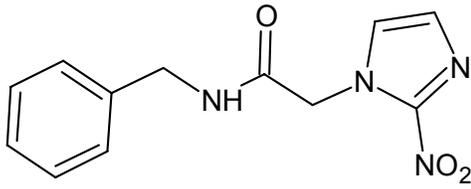
El uso de estas drogas para el tratamiento durante la fase aguda de la enfermedad es ampliamente aceptado. El paciente es tratado independientemente de la forma de infección y cerca del 60% de ellos puede ser curado durante esta fase (Urbina, 2003). Sin embargo su efectividad durante la fase crónica de la enfermedad permanece controversial (Castro y cols., 2006).

La razón para esta controversia se basa en diferencias entre el momento que se inicia el tratamiento farmacológico respecto del tiempo de infección del paciente. Así, pacientes tratados durante la fase crónica temprana tienen un mejor pronóstico de pacientes tratados en la fase crónica tardía de la enfermedad (Urbina, 2003; Castro y cols., 2006).

La efectividad de ambos nitroderivados es mejor sobre la forma infectante extracelular de *Trypanosoma cruzi* que sobre la forma intracelular multiplicativa característica de la fase crónica de la patología. (Urbina 2003., Castro y cols., 2006).

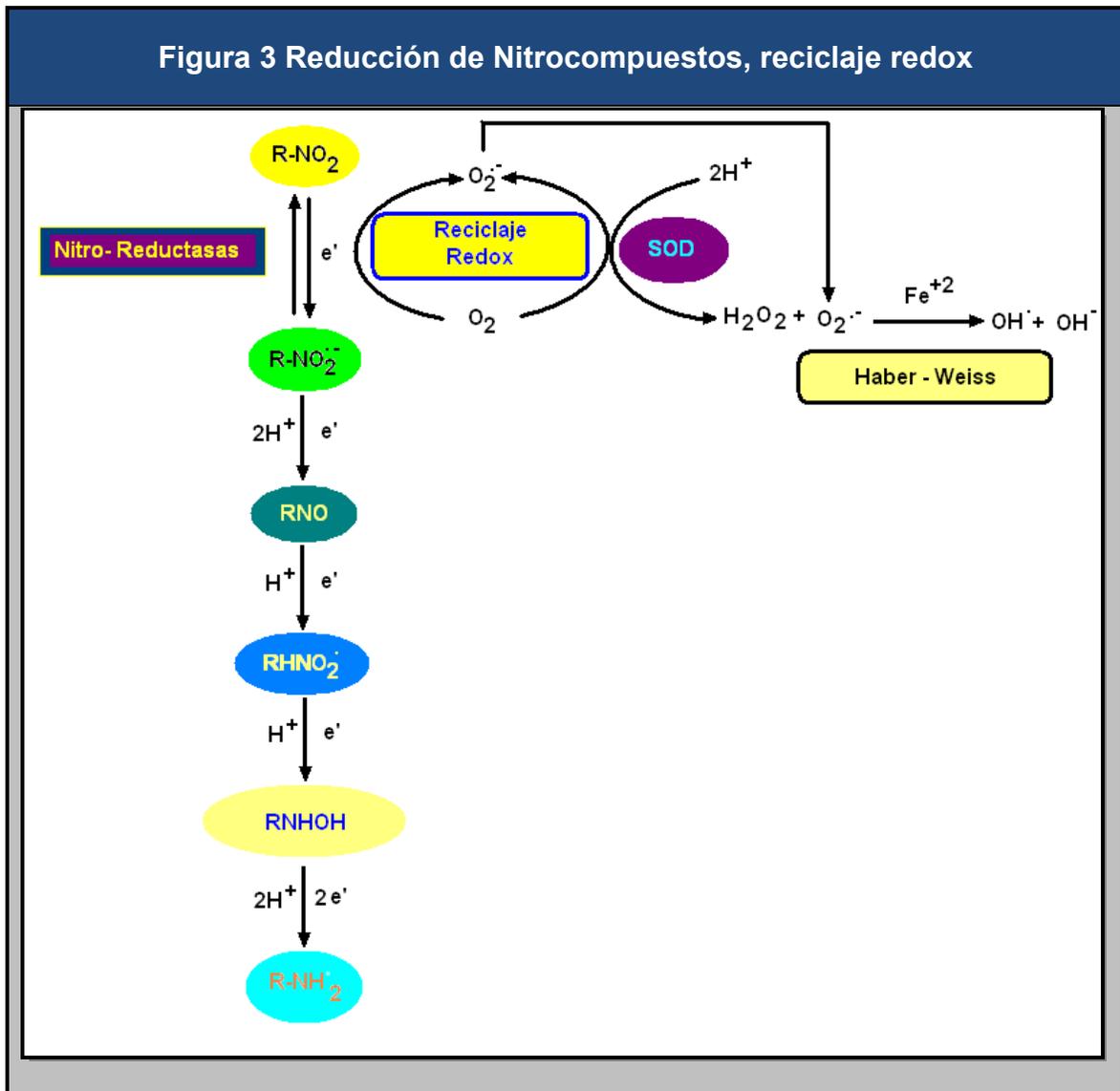
El Nifurtimox y el Benznidazol tienen acción tripanocida contra todas las formas del parásito (Stopani, 1999). Sin embargo, pueden presentar una toxicidad

sistémica y efectos colaterales que van de leves a graves. Así, el Nifurtimox puede producir anorexia, náuseas, vómitos, depresión o excitación nerviosa, convulsiones, vértigo, cefalea, parestesias, neuropatías periféricas y dermatitis. Por su parte, el Benznidazol puede inducir náuseas, vómitos, amnesia, cefalea, polineuropatía, prurito y fiebre (Castro y cols., 2006). Se ha demostrado además, que estas dos drogas producen mutagénesis y daño al DNA, por lo que hay dudas acerca del beneficio de su uso (Zahoor y cols., 1987; Gorla y cols., 1989). Sin embargo, en grandes series de pacientes tratados con estos fármacos, no se ha encontrado mayores problemas relacionados con este punto, por lo que el riesgo es más teórico que observado (Apt, 1999). Por otro lado, se ha reportado que el efecto terapéutico de estos dos fármacos varía en pacientes provenientes de distintas áreas geográficas. Esta situación estaría dada probablemente a infecciones con distintas cepas de *Tripanosoma cruzi* que presentan respuesta diferencial a estos fármacos (Castro y cols., 2006).

Figura 2 Fármacos antichagásicos Nifurtimox y Benznidazol	
Nifurtimox	Benznidazol
	

Mecanismo de acción del Nifurtimox y del Benznidazol

El mecanismo de acción de las drogas Nifurtimox y Benznidazol es a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos.



Como se observa en la figura 3, el grupo nitro de ambas drogas, por acción de nitroreductasas, requiere de seis electrones para reducirse a grupo amino, lo cual genera varios radicales libres y metabolitos electrófilos (Moreno y cols., 1982). El proceso mediante el cual se forman los radicales libres se inicia por una reacción catalizada por flavoproteínas, incluyendo la NADPH-citocromo P-450 reductasa, que actúa directamente sobre el grupo nitro de las moléculas R-NO₂, produciendo un radical intermediario anión nitro (R-NO₂⁻) (Moreno y cols., 1982). Este radical intermediario entra en reciclaje redox con el oxígeno molecular produciendo una reducción parcial del oxígeno y regenerando la droga (Mason y Holtzman, 1975). El anión superóxido (O₂⁻) es dismutado a H₂O₂ por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Temperton y cols., 1998). El anión superóxido (O₂⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), en presencia de Fe³⁺ forman el radical libre hidroxilo (OH[·]) (Reacción de Haber-Weiss Fenton). Estos radicales libres, fundamentalmente el OH[·], alteran la estructura de macromoléculas biológicas: lípidos, proteínas y DNA y por lo tanto, podrían producir mutagénesis y carcinogénesis. Del mismo modo se ha descrito el daño oxidativo de estos radicales en presencia de cobre sobre membranas celulares y sobre ciertas proteínas relacionadas con la detoxificación de especies reactivas (Letelier y cols., 2005., Letelier y cols., 2006).

Cuando se añade Nifurtimox a cultivos de *Trypanosoma cruzi*, aparece un espectro EPR característico correspondiente al radical anión nitro (Docampo y Stopanni, 1979; Docampo y cols., 1981; Docampo y Moreno, 1984). Es más, la

concentración de Nifurtimox (10-20 μM) a la cual se inhiben los cultivos de epimastigotes es similar a la requerida para la máxima producción de anión superóxido e iniciar la salida de peróxido de hidrógeno desde la célula (Docampo y Stoppani, 1979; Moreno y cols., 1982. Docampo y Moreno, 1984). Estos y otros experimentos (Docampo y Stoppani, 1980; Dubin y Cols. 1983) sugieren que la generación de radicales libres del oxígeno derivados de reducción intracelular del Nifurtimox es el mecanismo de acción de esta droga contra el *Trypanosoma cruzi*.

Cuando se añade Benznidazol a homogenizados de *Trypanosoma cruzi* conteniendo NADPH, se genera una débil señal EPR, correspondiente al radical anión nitro (Docampo y Moreno, 1984). El Benznidazol inhibe el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* a concentraciones que no inducen la generación de O_2^- y H_2O_2 . Estos resultados indican que el efecto tripanocida no depende de radicales del oxígeno como ocurre con el Nifurtimox (Moreno y cols., 1982). Parece probable que los metabolitos reducidos del Benznidazol, mediante unión covalente con macromoléculas están involucrados en sus efectos tóxicos y tripanocidas (Docampo y Stoppani, 1979; Masana y cols., 1984; Diaz de Toranzo y cols., 1988; Aldunate y Morello, 1993; Maya y cols., 1997). Esta hipótesis es apoyada por la observación de que la generación de radicales nitro provenientes del Benznidazol tiene un efecto importante sobre el proceso infectivo de los tripanosomas, mejorando la fagocitosis y aumentando la muerte del parásito (Murta y cols., 1999, Castro y

cols., 2006). Por otro lado, se ha reportado que el Benznidazol inhibe la NADH-fumarato reductasa de *Trypanosoma cruzi* produciendo alteraciones en la cadena respiratoria en el parásito (Turrens y cols, 1996) y además, gatillaría la expansión de células T CD8+ promoviendo resistencia a una eventual reinfección dada las propiedades antiparásitarias de estas células (Olivieri y cols., 2002), constituyéndose potencialmente en una importante herramienta terapéutica en las zonas endémicas mas pobres de Latino América.

Existen investigaciones experimentales que demuestran diferencias en la respuesta a Nifurtimox y a Benznidazol, por parte de diferentes cepas de *T. cruzi* al (Urbina y Docampo 2003, Castro y cols., 2006). La explicación a este fenómeno es desconocida, aunque se ha propuesto un incremento en la concentración de las enzimas de detoxificación o a través de modificaciones en el contenido de tioles intracelulares (Morello y cols., 1994; Maya y cols., 1997).

Metabolismo de tioles y defensa contra radicales libres

Las células de mamíferos poseen mecanismos de defensa anti-radicalarios enzimáticos y no-enzimáticos (Gutteridge y Halliwell, 2000; Halliwell, 1999). Entre los enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa, la catalasa, la Glutación peroxidasa y la Glutación-S-transferasa y entre los no-enzimáticos, los compuestos reductores GSH, α -tocoferol, ácido ascórbico y β -caroteno. Sin embargo, los mecanismos de defensa del parásito frente al estrés oxidativo son

deficientes (Krauth-Siegel y Coombs, 1999). No se ha detectado actividad de las enzimas catalasa y Glutación peroxidasa selenio dependiente (Mehlotra, 1996) y la actividad de la superóxido dismutasa se encuentra muy reducida (Ismail y cols., 1997; Temperton y cols., 1998); no obstante esta enzima ha demostrado ser inducible en condiciones de estrés oxidativo confiriendo protección al parásito contra radicales libres y agentes electrofílicos como el Benznidazol (Nogueira y cols., 2006; Piacenza y cols., 2007). Por otra parte, no se ha detectado la existencia de β -caroteno y α -tocoferol, reductores presentes en células de mamíferos. Cabe señalar además, que se ha descrito la presencia de actividad de las enzimas ascorbato reductasa y deshidroascorbato reductasa en epimastigotes y tripomastigotes, lo cual sugiere la presencia de un ciclo redox del ácido ascórbico, semejante al de las células de mamífero. (Clark y cols., 1994). Por otra parte se ha demostrado que el tripomastigote presenta en el glicosoma la capacidad de sintetizar ascorbato así como la de incorporarlo activamente (Wilkinson y cols., 2005).

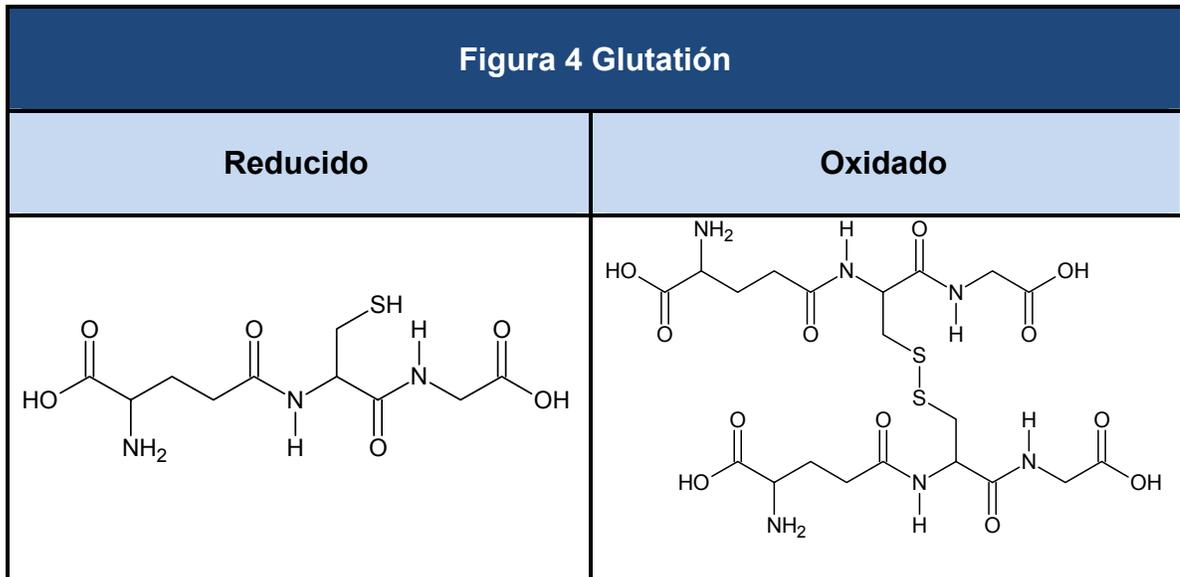
Dado que los mecanismos antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) del *Trypanosoma cruzi* son deficientes respecto a las células de mamífero, sus principales mecanismos de defensa contra radicales libres serían el Glutación reducido y un conjugado de Glutación y espermidina denominado Tripanotión. Este compuesto es característico de todos los tripanosomátidos y es indispensable para la reducción del Glutación (Krauth-Siegel y Coombs, 1999).

El Glutati3n (γ L-glutamil-L-cisteinil-glicina) (Figura 4) es el tiol de bajo peso molecular m1s abundante en las c3lulas de mam1feros. Se le ha encontrado en casi todos los seres vivos (Sies, 1999) en concentraciones que fluct1an entre 0,5 y 10 mM, dependiendo de la especie, 3rgano u organelo estudiados.

El Glutati3n tiene como funci3n, entre otras, la protecci3n de los efectos t3xicos producidos por ciertos compuestos altamente electrof1licos como son ciertos xenobi3ticos, metabolitos de xenobi3ticos y contra los radicales libres (Sies, 1999).

Este trip3ptido (ver figura 4) juega un rol fundamental en la detoxicaci3n de metales pesados, herbicidas e insecticidas (Keppler, 1999; Fu, 1999; Eaton, 2000; Pourahmad y O'Brien, 2000). As1, a) act1a como cofactor en reacciones catalizadas por las Glutati3n-S-transferasas, enzimas que conjugan GSH con una variedad de xenobi3ticos de car1cter lipof1lico-electrof1lico; (Griffith y Mulcahy, 1999) b) juega un papel importante en la protecci3n del DNA (Mazur, 2000) y de la membrana lip1dica del da1o producido por radicales libres (Hayes y Mclellan, 1999); c) act1a efectivamente como atrapador de radicales libres y participa como un cofactor del ciclo Glutati3n peroxidasa/Glutati3n reductasa d) actuar1a en forma no enzim1tica frente al per3xido de hidr3geno, radicales libres (Sies, 1999) y en la reacci3n con metales pesados y agentes electrof1licos (Estrela y cols., 2006). Participando como agente reductor en

presencia de estos agentes oxidantes, producto de estas reacciones se genera glutatión oxidado. (Figura 4).



La Glutatión reductasa, enzima encargada de reducir el Glutatión oxidado en mamíferos tiene una actividad prácticamente irreversible con el Glutatión oxidado, manteniendo la razón GSH/GSSG muy alta (Estrela y cols., 2006). Hay estudios que sugieren que esta enzima puede catalizar la reducción de disulfuros mixtos entre el Glutatión y otros compuestos, como por ejemplo, Glutatión y γ -glutamil cisteína o entre Glutatión y coenzima A (Luo y cols. 2006). A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, en *Trypanosoma cruzi* la reducción de GSSG se efectúa por intermedio del Tripanotión; no se ha encontrado la enzima Glutatión reductasa (Fairlamb y Cerami, 1985).

El Glutathión es sintetizado mediante la acción sucesiva de las enzimas γ -glutamil cisteinil sintetasa y la Glutathión sintetasa, cuyas actividades dependen de ATP (ver figura 5). El Glutathión reducido inhibe por retroalimentación de manera no alostérica a la γ -glutamil-cisteinil sintetasa. La degradación del Glutathión es catalizada por las enzimas γ -glutamil transpeptidasa, γ -glutamil ciclotransferasa y 5-oxo-prolinasa. Todas estas enzimas conforman el denominado ciclo del γ -glutamilo (Estrela y cols., 2006) (Figura 6).

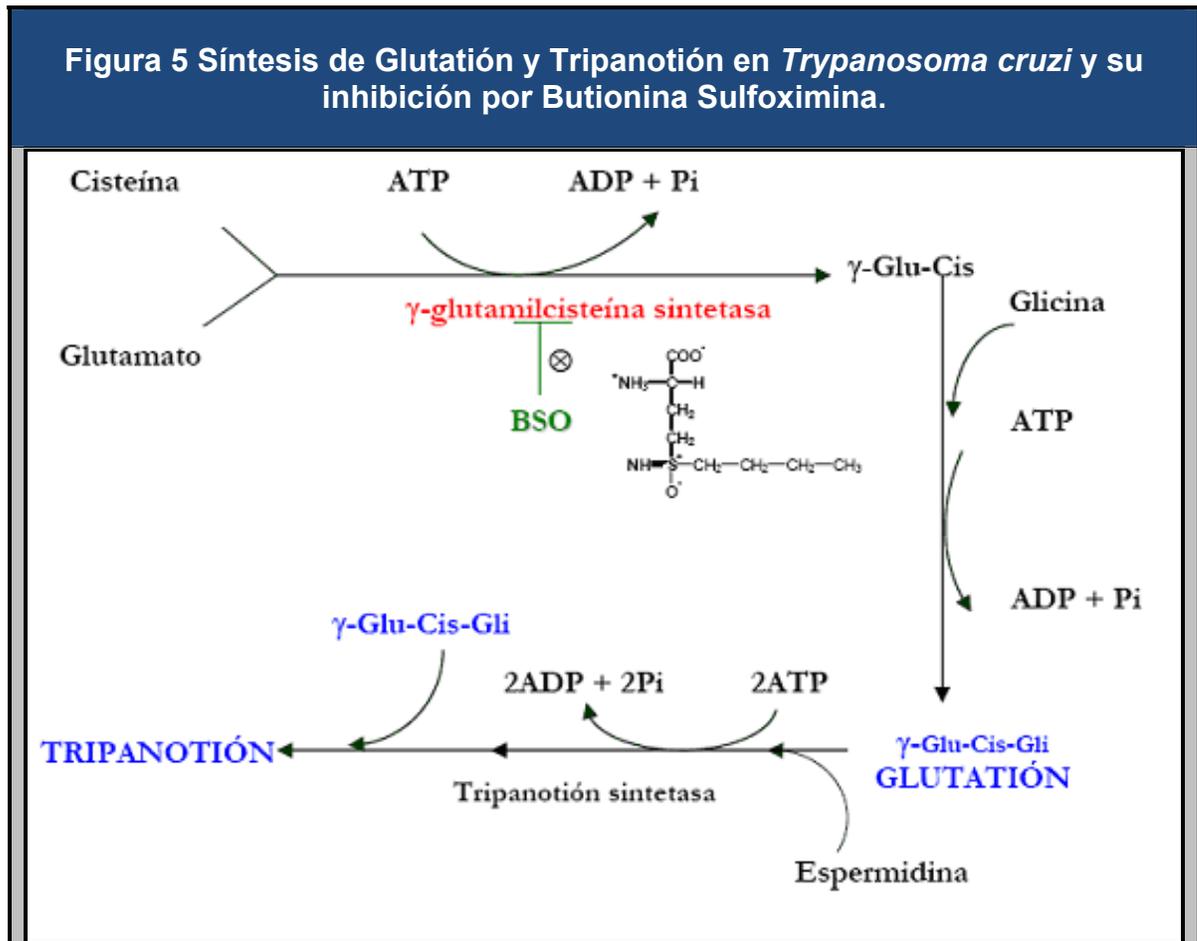
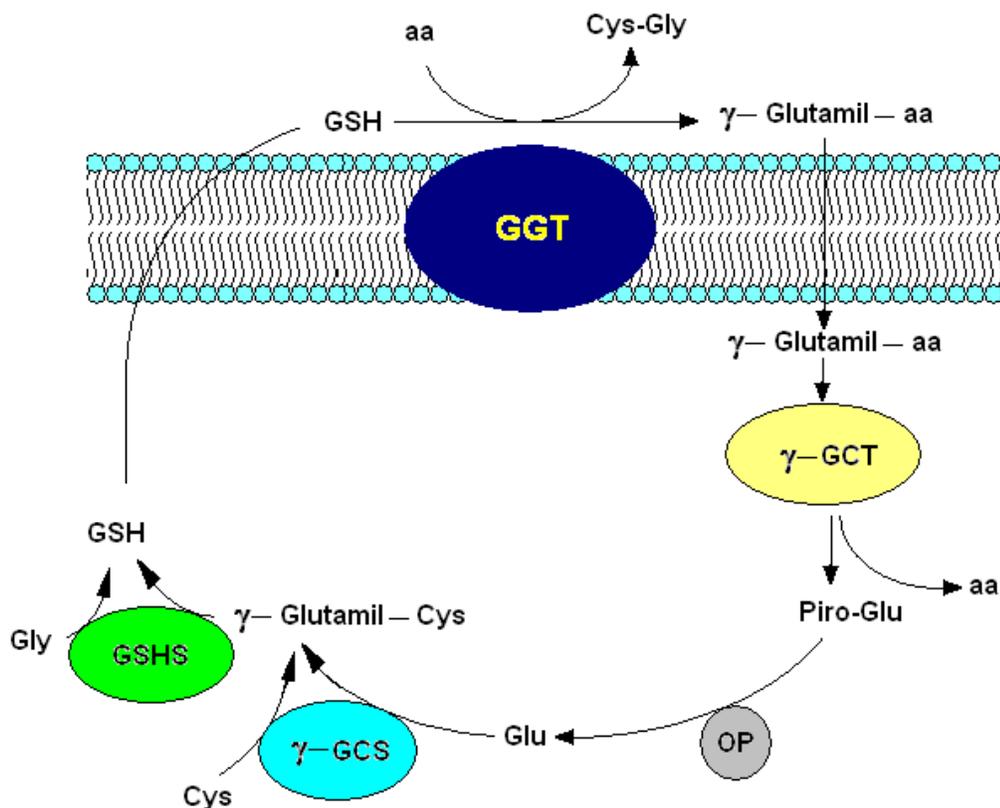


Figura 6 Ciclo del gama-glutamilo



aa, aminoácidos; Cys-Gly, Cisteinil-glicina; γ -GCT. Gama-glutamil ciclotransferasa; OP: Oxoprolinasa; γ -GCT: gama-glutamil cistein sintetasa; GSHS; Glutación sintetasa. GGT Gama glutamiltranspeptidasa

La γ -glutamil-cisteinil sintetasa inicia la síntesis del Glutati3n y puede ser inhibida por un conjunto de an3logos qu3micos, siendo uno de ellos la D-L-Butionina [S,R] Sulfoximina (BSO) (Figura 5) (Anderson, 1998). La inhibici3n de la γ -glutamil-cisteinil sintetasa, se debe a que el BSO o su derivado fosforilado por ATP se une fuertemente, pero no en forma covalente, al sitio activo de la enzima. (Griffith y Mulcahy, 1999; Estrela y cols. 2006).

Debido a que el carbono alfa y el azufre de la BSO son centros quirales, la DL-SR-BSO es una mezcla de cuatro is3meros, al respecto, Tate y Meister, (1974) indicaron, que el is3mero L-S-BSO es el m3s potente inhibidor de la enzima. La L-S-BSO, en un principio se une al sitio de uni3n del glutamato y ciste3na simulando al estado de transici3n previo a la uni3n de estos amino3cidos, donde la L-S-BSO simula al intermediario tetra3drico formado cuando la ciste3na reacciona con el gamma-glutamil fosfato en la reacci3n normal. La fuerza de esta uni3n primaria es dif3cil de determinar ya que la BSO es r3pidamente fosforilada formando una uni3n muy firme con la enzima (Griffith y Mulcahy, 1999). Por otra parte, la L-R-BSO presenta una estructura tetra3drica similar pero que no es fosforilada inhibiendo en forma reversible y competitiva (con L-glutamato) a la enzima, presentando un valor de K_i de 0,15 mM, este valor es significativamente menor que la K_m observada para L-glutamato (1,5 mM) sugiriendo que una configuraci3n tetra3drica S provee una mayor afinidad para la uni3n, y soporta la caracterizaci3n de L-S-BSO como un inhibidor ya

que simula el estado de transición de una forma relativamente irreversible (Griffith y Mulcahy, 1999).

La administración de L-S,R-Butionina Sulfoximina a animales a dosis de 2 mmol/Kg bloquea la síntesis de GSH prácticamente en todos los tejidos (Griffith y Meister 1979), cuando esta disminución en la concentración de GSH se estudió en tejido neoplásico, se observó que la velocidad de recuperación de los niveles de GSH eran inferiores en los tumores que en el tejido normal, esto evidenció la posible utilidad de este inhibidor como agente sensibilizante de tumores a la radiación y a los agentes quimioterapéuticos (Bailey y cols. 1994). Al respecto se relacionó la eliminación de tumores con la disminución de los niveles de GSH mediado por BSO al ser tratados con distintos agentes alquilantes y cisplatino mostrando un mínimo aumento de las reacciones adversas clásicas mediadas por estos agentes quimioterapéuticos (Bailey y cols., 1994).

Estudios conducidos por Bailey y cols., utilizaron L-S,R-Butionina Sulfoximina a dosis de 1,5 a 13,1 g/m² administrada cada 12 horas, por un máximo de 5 días, la toxicidad presentada a este tratamiento, se limitó sólo a náuseas y vómitos (Bailey y cols, 1994).

La relación entre contenido de GSH, Quimioterapia y respuesta a radiación ha sido examinada en muchas líneas tumorales previo tratamiento con BSO.

Células cancerosas con bajos niveles de GSH demostraron ser mucho más sensibles a radiación gama comparadas con el control. Sin embargo, BSO induce una disminución de los niveles de GSH *in vivo* que no selectiva a la célula tumoral, lo cual se puede traducir en deleciones del DNA del tejido sano, que podría jugar un rol importante en carcinogenicidad en estos tejidos. Aparentemente sólo si la disminución de los niveles de GSH es selectiva a células cancerosas, se podría disponer de una terapia efectiva. Hasta la fecha no se dispone de una tecnología capaz de disminuir los niveles de GSH en una célula tumoral, sin afectar el tejido normal (Estrela y cols., 2006).

Se ha descrito que una disminución en la relación GSH/GSSG, funciona como señal intracelular que media la expresión de diferentes factores transcripcionales tales como NF- κ B y AP-1, y la modulación de varias vías transduccionales, como la regulación del receptor de insulina, la actividad enzimática de ciertas fosfatasas y kinasas y la amplificación de funciones inmunológicas. (Dröge, 2002). Hasta este momento no se ha descrito la relación entre la expresión y/o actividad de nitroreductasas y una disminución de la relación GSH/GSSG.

Es interesante anotar que Benznidazol, fármaco capaz de disminuir los niveles intracelulares de GSH, inhibe la disponibilidad de NF- κ B en macrófagos estimulados, inhibiendo la proteólisis de I κ B, demostrando que el Benznidazol es capaz de inhibir específicamente la activación de NF- κ B en macrófagos

después de una estimulación de estos con IFN-gamma y LPS (Piaggio y cols., 2001). De esta forma, este compuesto presentaría un efecto inhibitorio sobre la secreción de ciertas citokinas como PGE2, contribuyendo a disminuir infección del parásito sobre macrófago ya que el proceso apoptótico, fundamental para el parásito, se ve disminuido mediado por una disminución en los niveles de TGF-B1. (Freire da lima y cols., 2002)

La γ -glutamil transpeptidasa, además de ser responsable del catabolismo del Glutación, participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana (Griffith, 1999; Sies, 1999).

Por otra parte, algunos metabolitos provenientes de la conjugación de xenobióticos con GSH, reacción catalizada por las Glutación-S-transferasas, son degradados en una primera etapa por la γ -glutamil transpeptidasa, donde la enzima elimina el grupo γ -glutamilo. Posteriormente, el derivado S-conjugado pierde el grupo glicilo y luego es acetilado. Este último compuesto recibe el nombre de ácido mercaptúrico, el cual es eliminado fácilmente por la orina (Keppler, 1999).

Dado que el Glutación actúa efectivamente como atrapador de radicales libres, tiene la capacidad de conjugarse con especies electrofílicas y actúa como cofactor enzimático de enzimas antioxidantes (Sies, 1999) y las drogas antichagásicas como son el Nifurtimox y el Benznidazol, producen su efecto

farmacológico mediante la generación (por nitro reducción) de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos, una depleción en los niveles de Glutación, resultaría en un posible aumento de los efectos secundarios descritos para estos agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, la célula de mamífero, al poseer una mayor cantidad de mecanismos antioxidantes, debería experimentar aumentos discretos en los efectos deletéreos mediados por estas drogas. Además los diversos estudios citados anteriormente, referentes al uso concomitante de drogas antineoplásicas y L-S,R-BSO, demostraron que los aumentos de los efectos secundarios mediados por esta terapia son leves comparados con la utilización del citostático en forma aislada. Recientemente se ha reportado el efecto de BSO sobre el DNA en ratones tratados con BSO. (Reliene y cols., 2006).

Por otra parte, una inhibición sostenida de la γ -glutamyl-cisteinil sintetasa con la consecuente disminución de los niveles de Glutación, y aumento de especies electrofílicas podrían traducirse en algunos cambios adaptativos como un aumento en la expresión de la enzima o aumento de la actividad de la misma, efecto descrito en mamíferos (Dickinson y cols., 2004) o como el aumento en la expresión de metalotioneinas frente a una disminución de GSH descrita recientemente en *T. cruzi* (Maya y cols., 2004). Además en mamíferos, esta enzima ha demostrado ser inducida y/o activada en respuesta a estrés oxidativo, citoquinas inflamatorias, algunos fármacos e incluso ante la presencia de antioxidantes. (Griffith, 1999). Del mismo modo se ha descrito

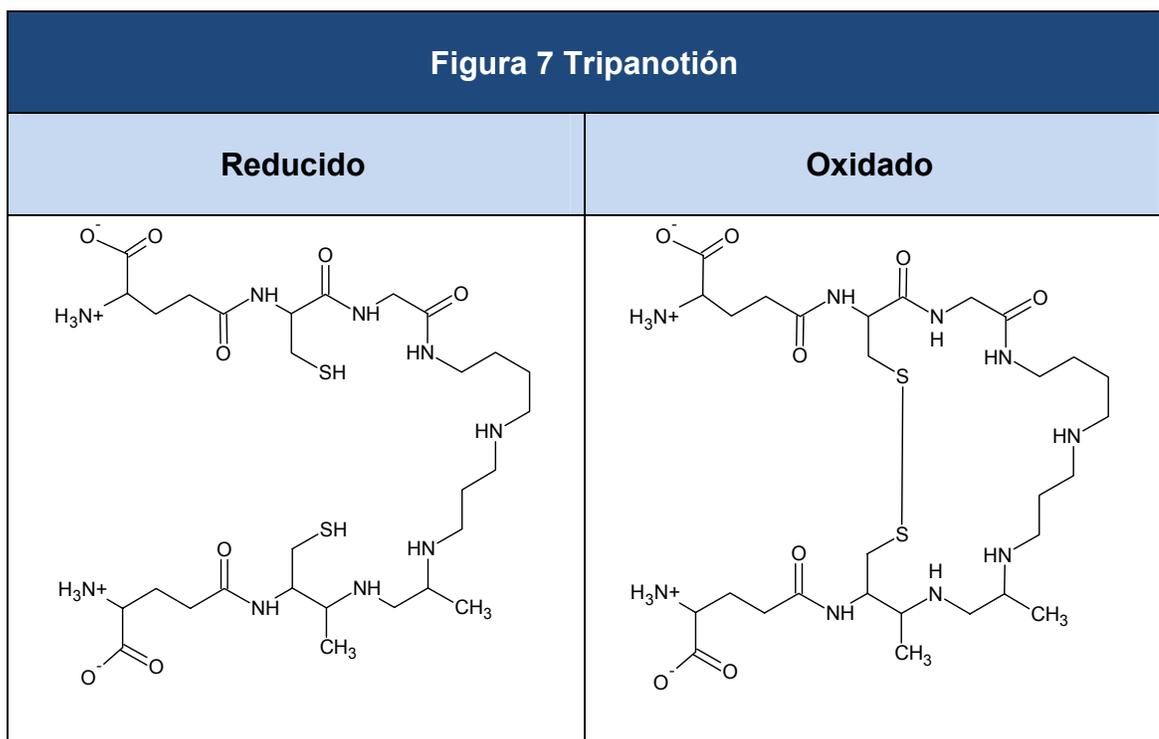
que el Factor de Necrosis Tumoral α induce una activación coordinada de las enzimas necesarias para la síntesis de GSH vía activación del factor nuclear κB y AP-1. (Yang y cols. 2005). Las implicancias de estos y otros posibles procesos adaptativos tanto en el huésped como en el parásito podrían influir en la efectividad de la terapia concomitante entre BSO y drogas antichagásicas.

El Tripanotión (N1, N8-bis(glutationil) espermidina, $(T(SH)_2)$ (Figura 7) es un tiol de bajo peso molecular sintetizado por la conjugación de dos moléculas de Glutación reducido y espermidina, en una reacción dependiente de ATP (Fairlamb y Cerami, 1985., Fairlamb y cols., 1987;). Esta reacción es catalizada por dos enzimas, la glutacionil-espermidina sintetasa y la Tripanotión sintetasa. Ambas enzimas son muy específicas y características de los tripanosomátidos (Fairlamb y Cerami, 1992). Recientemente se demostró que en *T. cruzi* y *T. brucei* la síntesis de Tripanotión es realizada en forma exclusiva por la enzima Tripanotión sintetasa, (Oza y cols. 2002).

El Tripanotión necesita dos electrones para reducirse y a pH fisiológico tiene una carga de +1. Su potencial redox ($T(SH)_2/T(S)_2$) es de $E^{\circ} = -0,24 \pm 0,02$ V (Fairlamb y Cerami, 1992), siendo ligeramente más electronegativo que el del Glutación (-0.23 V). Estas características le confieren un poder reductor importante. Hay estudios que muestran que $T(SH)_2$ es mejor radioprotector del DNA que el GSH o la espermidina, presumiblemente porque la espermidina del

T(SH)₂ permite, por su carga positiva, una mayor concentración local de grupos SH cerca del DNA (Awad y cols., 1992).

El rol del Tripanotión reducido en los tripanosomátidos se caracteriza por ser la molécula que reduce al Glutatiión oxidado y además, tiene una función equivalente a la del Glutatiión en los mamíferos, es decir, actúa como un protector intracelular frente a agentes oxidantes endógenos y exógenos (Fairlamb y Cerami, 1992). Otras funciones del Tripanotión incluyen la mantención de la homeostasis de ascorbato (Krauth-Siegel y Lüdemann, 1996), la reducción de hidroperóxidos (Wilkinson y cols, 2000), la síntesis de desoxirribonucleotidos así como conjugación con metales y drogas (Dröge, 2002). Actuando como agente reductor de la misma forma que el glutatiión.



Podemos concluir que en los tripanosomátidos, los sistemas de defensa son deficientes frente al estrés oxidativo comparado con los de los mamíferos. El *T. cruzi* presenta actividad superóxido dismutasa muy baja, ausencia de Glutación peroxidasa y catalasa y no se ha demostrado la presencia de α -tocoferol o de β -caroteno (Aldunate y Morello, 1993). De lo anterior se desprende que, el principal mecanismo de defensa de estos parásitos frente al estrés oxidativo estaría dado por el Glutación y el Tripanotión, siendo esta última molécula una característica exclusiva de los tripanosomátidos.

HIPOTESIS

Dado que el Glutati3n y su an3logo conjugado (Tripanoti3n) constituyen el principal mecanismo de defensa a radicales libres y agentes electrof3licos, producidos por las drogas antichag3sicas de uso cl3nico, como son el Nifurtimox y el Benznidazol, se postula que:

La inhibici3n de la s3ntesis de GSH por BSO, potencia el efecto farmacol3gico de Nifurtimox y Benznidazol

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Potenciar la actividad tripanocida de Nifurtimox y Benznidazol, inhibiendo la síntesis de GSH en distintos modelos *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad de Chagas

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el efecto de Butionina Sulfoximina sobre el contenido de tioles en las distintas formas de *Trypanosoma cruzi*
2. Determinar el efecto de BSO, Nifurtimox, Benznidazol y de las distintas combinaciones de BSO-Nifurtimox y BSO-Benznidazol sobre el crecimiento y viabilidad de epimastigotes de distintas cepas de *Trypanosoma cruzi*.
3. Evaluar el efecto tripanocida de BSO, Nifurtimox, Benznidazol y de las combinaciones BSO-Nifurtimox y BSO-Benznidazol en células VERO infectadas con *Trypanosoma cruzi*.

4. Evaluar el efecto tripanocida de BSO, Nifurtimox, Benznidazol y de las combinaciones BSO-Nifurtimox y BSO-Benznidazol en tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*

5. Evaluar el efecto de BSO, Nifurtimox, Benznidazol y de las combinaciones BSO-Nifurtimox y BSO-Benznidazol en ratones infectados con distintas cepas de *Trypanosoma cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES

Las distintas cepas de parásitos se obtuvieron de la colección de *T. cruzi* del laboratorio de Farmacología y Bioquímica de Parásitos, de la facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La Triptosa, la triptona, el extracto de levadura y el suero neonato de bovino se obtuvieron de Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

El EDTA, el estándar de albúmina de bovino, el bicarbonato de sodio, el d-canfor-sulfónato de litio, el ácido metanosulfónico, la L-Butionina sulfoximina, la fenazina metosulfato y el SDS se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

El KOH, el NaOH, el NaHCO₃, el NaCl, el KH₂PO₄, el tartrato de sodio y potasio, el reactivo de Folin, el 1-propanol, el metanol, el etanol, y el DMSO se obtuvieron de Merck, Darmstadt.

El Monobromobimano (tiolite) y el HEPPS se obtuvieron de Calbiochem Corporation.

El Nifurtimox se obtuvo de laboratorios Bayer y el Benznidazol se obtuvo de laboratorios Roche.

En esta tesis se trabajó con material patógeno como es el *T. cruzi*. Los experimentos se realizaron en un laboratorio exclusivo para el cultivo, manipulación y experimentación con tripanosomas vivos o viables donde se operó con guantes, lentes y en campana de flujo laminar.

II. MÉTODOS

Células VERO:

Se sembraron células tipo fibroblastos de riñón de mono verde (VERO) en frascos de cultivo Falcon de 25 cm² a una densidad de 4.000 células/cm², en medio RPMI suplementado con bicarbonato de sodio 0,22%, estreptomycin 100 µg/mL, penicilina 100 µg/mL y suero fetal bovino al 10% para crecimiento o al 5% para mantenimiento. Una vez que hubo confluencia de las células VERO, se cambió el medio de cultivo por medio fresco con o sin BSO o drogas y se incubó las células a 37°C en ambiente humidificado y CO₂ 5% durante 96 horas, cambiando el medio cada 24 horas. (Urbina y cols., 2000).

***Trypanosoma cruzi* tripomastigotes:**

Se infectaron células VERO con tripomastigotes presentes en cultivos de epimastigotes envejecidos. De esta manera se obtuvieron los primeros tripomastigotes. Posteriormente células VERO se infectaron directamente con tripomastigotes obtenidos por este método, a la relación de tres parásitos por célula en cepa MF, LQ, y en una relación de diez parásitos por célula en la cepa Tulahuén y Dm28c (Contreras y cols., 1985).

Determinación de tioles:

El contenido de Glutati6n de células VERO, de tripomastigotes, epimastigotes y amastigotes, se determin6 mediante derivaci6n con monobromobimano y separaci6n del aducto fluorescente por HPLC. El sedimento producido por la centrifugaci6n a 10000 x g de la respectiva suspensi6n de c6lulasu homogenizado de tejido, equivalente a 1 mg de prote6na (Lowry y cols., 1951), se suspendi6 en HEPPS 40 mM, EDTA 2 mM a pH 8 y monobromobimano 2 mM y se calent6 a 70°C por 3 minutos, para formar los aductos fluorescentes. Se precipitaron las prote6nas con 6cido metano-sulf6nico 4 M a 4 °C por 10 minutos. El sobrenadante resultante de la centrifugaci6n a 10000 x g durante 10 minutos fue filtrado a trav6s de una membrana de nylon 0.2 μ y 4 mm, y se aplic6 a una columna HPLC de fase reversa Lichrospher 100 RP-18 (5 μ m) usando como fase m6vil α -canforsulfonato de litio al 0,25% (p/v) en agua

bidestilada a pH 2,65 (solución A) y 25% (p/v) de n-propanol en A (solución B). Las mediciones se llevaron a cabo en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia L-6200 Intelligent-pump, eluyendo durante 70 minutos a un flujo de 1 mL/min, usando el siguiente esquema: De 0 a 20 minutos, 90% de solución A y 10% de solución B; de 20 a 40 minutos, 10% a 50% de B en gradiente lineal; de 40 a 70 minutos, 50% de B isocrático en A, regresando a las condiciones iniciales por 30 minutos. La detección del aducto fluorescente se realizó en un espectrofotómetro de fluorescencia F-1050 y un integrador de datos D-2500 (Merck-Hitachi), empleando una longitud de onda de excitación de 385 nm y de emisión de 480 nm. (Fairlamb y cols., 1987; Repetto y cols., 1996; Maya y Cols., 1997).

La molécula de GSH se identificó por el tiempo de retención que presenta en el HPLC (Fairlamb y cols., 1987) y la concentración del tiol se calculó partir de una curva estándar de picomoles de Glutatión reducido versus el área relativa del correspondiente pico del producto fluorescente. El área relativa del producto fluorescente es directamente proporcional a la concentración del tiol empleada.

Ensayos de Viabilidad:

El efecto de los diferentes tratamientos estudiados sobre la viabilidad celular se evaluó mediante la reducción mitocondrial de sales de tetrazolium o MTT a

formazán, que tiene un color púrpura y cuya absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas en el medio (Muelas y cols., 2002). A 100 μ L de la suspensión de parásitos se adiciona 10 μ L de MTT 5 mg/mL en presencia de fenazina metosulfato 0,22 mg/mL (como transportador de electrones), se incubó durante 4 horas a 28°C, y el precipitado de cristales de formazán fue disuelto en 100 μ L de SDS al 10% en HCl 0,01M incubándolo a 28°C o 37°C durante toda la noche. La intensidad del color se midió a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas Labsystems Multiskan MS, Finlandia.

Determinación de proteínas totales.

La cantidad de proteína en los distintos cultivos se determinó mediante el método de Lowry y colaboradores (1951), utilizando como estándar albúmina de bovino fracción IV.

Índice endocítico.

Se sembraron células VERO en frascos de cultivo Falcon de 25 cm², con medio RPMI suplementado con bicarbonato de sodio 0,22%, estreptomycin 100 μ g/mL, penicilina 100 μ g/mL y suero fetal bovino al 5 %, a una concentración de

100.000 células / mL e infectadas con tripomastigotes a la razón de 3 parásitos por célula en las cepas MF, LQ, y a una razón de diez parásitos por célula en la cepa Tulahuén y Dm28c.

Nifurtimox, Benznidazol y BSO y las combinaciones BSO-Droga se adicionaron pasadas 24 horas de la infección a las concentraciones descritas en las tablas. Cambiando los medios con y sin droga cada 24 horas. El efecto de los tratamientos sobre los amastigotes fue determinado luego de 120 horas, por visualización directa en un microscopio de contraste de fase (Zeiss Photomicroscope II) y por microfotografía. Para cada frasco de cultivo se determinó el número total de células VERO, el número de células infectadas y el número de amastigotes intracelulares a partir de 10 campos seleccionados aleatoriamente, del mismo modo se determinó la razón cantidad de proteína versus número de células VERO dado al aumento observado en este parámetro cuando las células están infectadas. El número de amastigotes se determinó dada la relación 1 mg de proteína corresponde a 220.000.000 de amastigotes. El Índice endocítico (Franke de Cazzulo y cols., 1998) corresponde a porcentaje de células VERO infectadas multiplicado por el promedio de amastigotes intracelulares.

Ratones

Se utilizaron ratones machos, de la cepa BALB/c de 4 a 6 semanas de edad, con un peso promedio de 20 ± 2 gramos, obtenidos del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, proporcionándoles alimento y agua *ad libitum*. El manejo de los ratones, contó con la aprobación del Comité de Bioética sobre Investigación en Animales, de la Facultad de Medicina, dentro del marco del proyecto FONDECYT 1061072.

Modelo de infección

Los ratones fueron inoculados intraperitonealmente con 30.000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa DM28c de *T. cruzi* y se dividieron aleatoriamente en grupos de 6 animales cada uno para la administración de los distintos tratamientos y controles.

Administración de drogas

Benznidazol se suspendió en agua destilada para su administración por vía oral, mediante una sonda orofaríngea, a razón de una dosis diarias de 100 mg/kg o 50 mg/kg, en un volumen final de 150 μ L para cada dosis. BSO se preparó en agua destilada estéril y se administró por vía intraperitoneal (i.p.), en un volumen final de 100 μ L para cada dosis, a razón de dos dosis diarias de

1000 o 125 μ moles/kg cada una. Esta dosis está justificada, por cuanto en ratones, BSO 2 mmoles/kg disminuye en más del 50 %, los niveles de GSH en todos los tejidos estudiados, sin la presencia de patologías asociadas o un comportamiento anormal de los ratones tratados (Griffith y Meister, 1979). Adicionalmente, en *T. brucei*, esta misma dosis es capaz de disminuir significativamente la cantidad de GSH, eliminando las parasitemias, sin producir toxicidad en los ratones tratados (Arrick y cols., 1981).

Estudio de parasitemia

Luego de confirmar la presencia de parásitos en sangre, lo cual ocurre entre 4 a 5 días después de la infección, se comenzó a evaluar cuantitativamente las parasitemias por microscopía directa (examen de sangre fresca) y se iniciaron los tratamientos. Los ratones infectados sin tratamiento y ratones infectados con tratamiento fueron monitoreados diariamente, para determinar la parasitemia. Se tomaron aproximadamente 50 μ L de sangre fresca de la punta de la cola de los animales infectados en un tubo de microhematocrito el cual una vez sellado, se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm y se dejaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se hizo recuento microscópico del sobrenadante. Los resultados del número de parásitos obtenidos en cada día de estudio se expresaron como promedio de parasitemia del grupo, más la desviación estándar correspondiente.

Estudios Histológicos:

Fijación

A los animales que murieron durante los distintos tratamientos se les extrajo el corazón y se suspendió inmediatamente en una solución de formalina al 10%.

Inclusión

Se aplicó una serie gradual de soluciones acuosas de menor a mayor concentración de Alcohol Etílico. Iniciando con alcohol al 50 %, luego con una solución de 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y finalmente alcohol al 100 % para eliminar el agua. Luego de deshidratar el tejido, se pasó a una solución de Xilol.

Posteriormente los tejidos fueron incluidos en parafina. Se colocaron las muestras de tejido en un recipiente y se le agregó la parafina fundida a 60° C, colocando la muestra en una estufa de 30 minutos a 6 horas manteniendo la temperatura a 60° C.

Después se colocó la muestra y un poco de parafina fundida en un molde de papel o metal de forma rectangular y se dejó solidificar a temperatura ambiente,

Las muestras fueron cortadas en un micrótopo y montadas sobre un portaobjeto. La parafina se eliminó utilizando Xilol y posteriormente se rehidrató haciéndola pasar por una serie de graduaciones decrecientes de alcohol etílico hasta llegar a una solución 100% de agua.

Poteriamente se sumergieron los portaobjetos con las muestras en solución de hematoxilina durante 5 minutos y posteriormente en solución de eosina por 5 minutos. Una vez teñido, se deshidrató nuevamente y se fijó con el cubreobjetos utilizando bálsamo de Canadá.

Análisis estadístico

Para determinar las diferencias entre las parasitemias de los grupos estudiados se utilizó la prueba del t-student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Para los análisis estadísticos se utilizó el software Origin® versión 7.0, de OriginLab Corporation. El análisis de supervivencia se hizo de acuerdo al método de Kaplan-Meier y la comparación de las curvas de sobrevida se realizó mediante el método log-rank, utilizando el software Graphpad prism 4.0, considerándose $p < 0,05$, como estadísticamente significativo. Todos los resultados se presentan como el promedio \pm DS de por lo menos tres experimentos independientes.

RESULTADOS

ESTUDIOS *IN VITRO*

Efecto de BSO sobre el contenido de tioles en *Trypanosoma cruzi*.

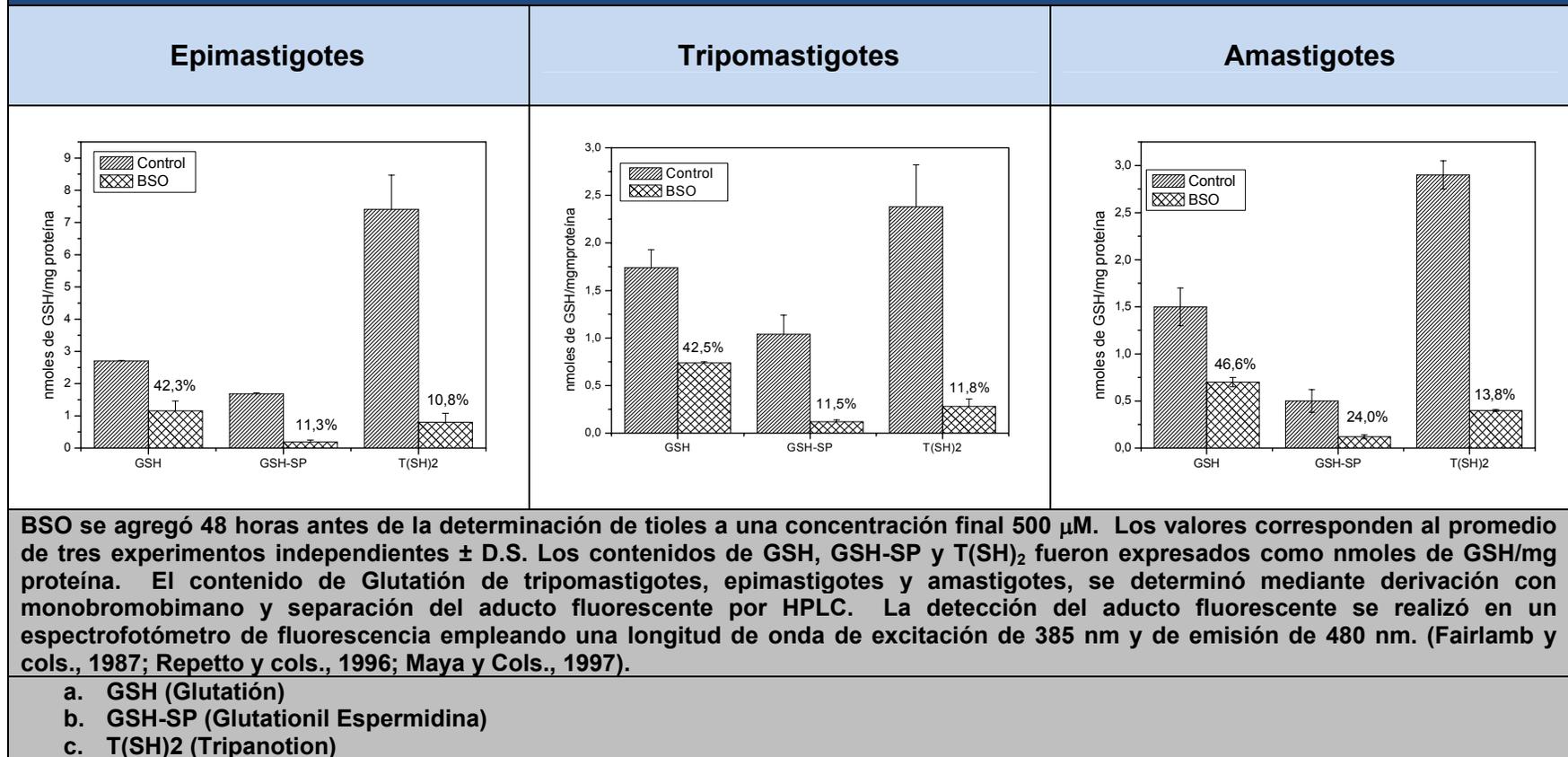
El GSH participa en una serie de procesos intracelulares entre los que destacan procesos inmunológicos, proliferación celular y protección contra la agresión oxidativa, además de ser precursor para la síntesis de T(SH)₂ en el parásito. Por otro lado, la BSO es un potente inhibidor de la síntesis de GSH en distintos tipos de células (Griffith, 1999, Estrela y cols., 2006.).

Se han realizado estudios fase I, donde se utiliza BSO para disminuir el contenido de Glutación en células tumorales. En dichos estudios se demostró que es posible alcanzar una reducción significativa de los niveles de GSH con dosis cercanas a 500 μ M en el estado estacionario, con una baja toxicidad por parte de esta droga (O'Dwyer y cols, 1996; Bailey y cols, 1997).

En base a esta información, trabajos realizado previamente en el laboratorio, determinaron que 500 μ M de BSO reducen significativamente el contenido de tioles libres de los epimastigotes de *T. cruzi* (Letelier, 2004). Por esto, y dado que este trabajo enmarca el estudio de todas las formas del parásito, en esta Tesis se estudió el efecto de BSO sobre la reducción de tioles en epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*.

En la Figura 8 podemos observar que el contenido de tioles totales disminuye alrededor de un 80% en todas las formas del parásito, siendo el Tripanotión, la especie tiólica más afectada por la acción de la BSO.

Figura 8 Efecto de BSO sobre el contenido de tioles en *Typanosoma cruzi*.



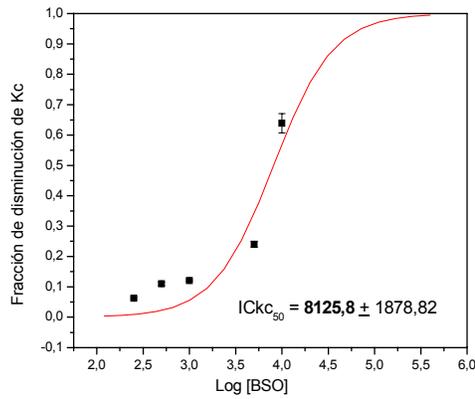
Determinación del efecto de Butionina Sulfoximina sobre el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Para determinar el posible efecto tóxico de la BSO sobre *T. cruzi*, se cultivaron 3×10^6 epimastigotes/mL de distintas cepas de *T. cruzi* (MF, LQ, Tulahuén y Dm28c) incubándolas con distintas concentraciones de BSO. A partir del análisis de las nefelometrías, como se describe en materiales y métodos, se graficaron los valores de constante de crecimiento (kc) obtenidos para cada una de las dosis estudiadas, y construyendo las curvas Dosis-Respuesta se calculó la concentración a la cual la constante de crecimiento disminuye en un 50% (**ICkc₅₀**) (Figura 9) valores que se detallan en la tabla 1.

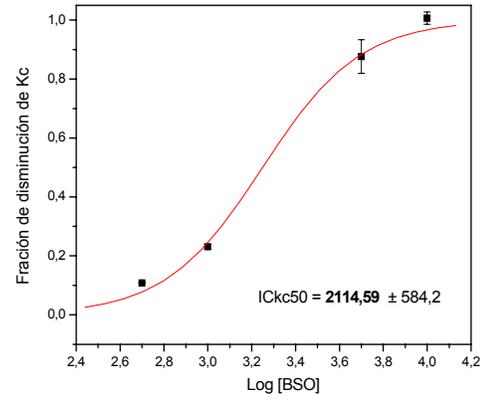
El crecimiento de epimastigotes de las distintas cepas de *T. cruzi* no se ve significativamente afectado a concentraciones menores a 0,5 mM de BSO, a excepción de la cepa Tulahuén. Lo anterior indica que el BSO tiene muy poca toxicidad a las concentraciones estudiadas.

Figura 9 Efecto de BSO sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*.

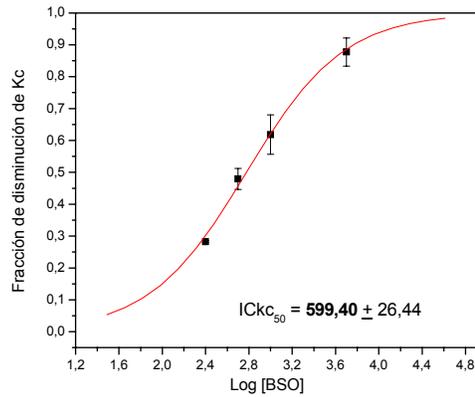
A. Cepa LQ



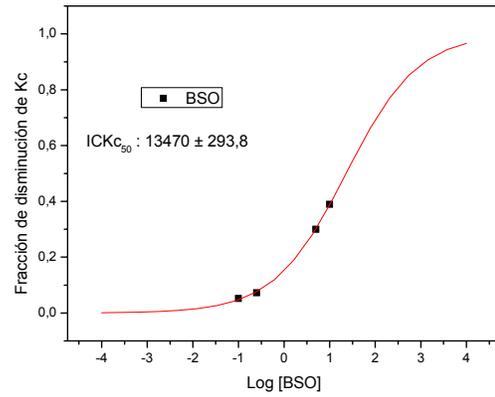
B. Cepa Dm28c



C. Cepa Tulahuén



D. Cepa MF



El crecimiento se determinó mediante nefelometría. (Ver materiales y métodos). Los valores de IC_{Kc50} se calcularon utilizando la herramienta Sigmoidal Fit / Dose-response del programa Originlab 7.5 y están expresados en concentraciones μM correspondiendo al promedio de tres experimentos independientes \pm D.S. La BSO se agregó el día cero.

Tabla 1 Valores de IC₅₀ para BSO sobre <i>T. cruzi</i>	
Cepa de <i>T. cruzi</i>	IC₅₀ [μM]
LQ	8125,8 ± 1878,8
DM28c	2114,6 ± 584,2
Tulahuén	599,4 ± 26,4
MF	13470 ± 293,8

Los valores de IC₅₀ se calcularon de acuerdo a lo explicado previamente y corresponden al promedio de tres experimentos independientes ± D.S. Valores obtenidos de la figura 6.

Determinación del efecto de drogas antichagásicas y su asociación con BSO sobre el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Los valores de IC_{Kc50} de Nifurtimox, Benznidazol y de sus respectivas asociaciones con BSO sobre el crecimiento epimastigotes de las distintas cepas de *T. cruzi* se resumen en la tabla 2. El Nifurtimox y el Benznidazol inhiben el crecimiento en cultivos axénicos de epimastigotes de *T. cruzi*. Al comparar estos valores con los obtenidos al asociar las drogas con BSO 500 μ M se observa una considerable disminución en el valor IC_{Kc50} apreciándose una potenciación del efecto tripanocida de ambas drogas en aproximadamente un 60%.

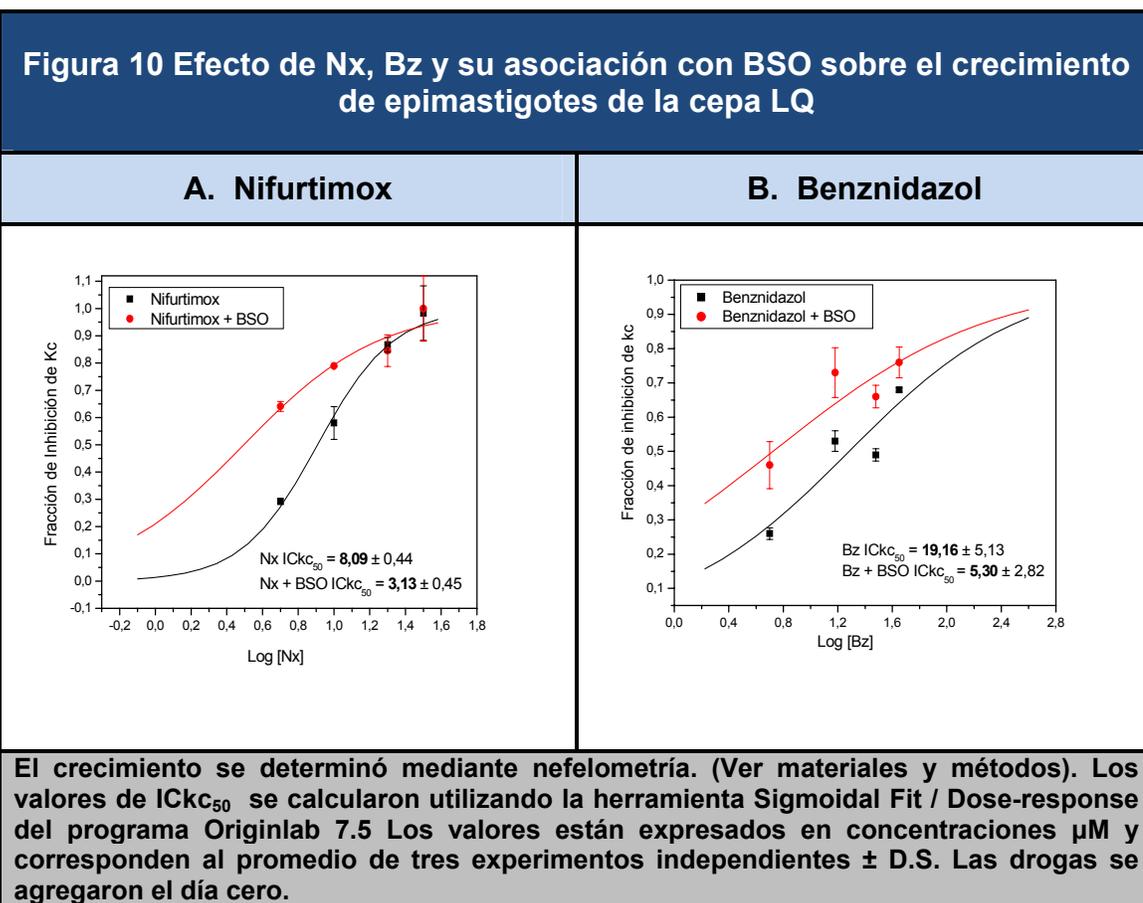
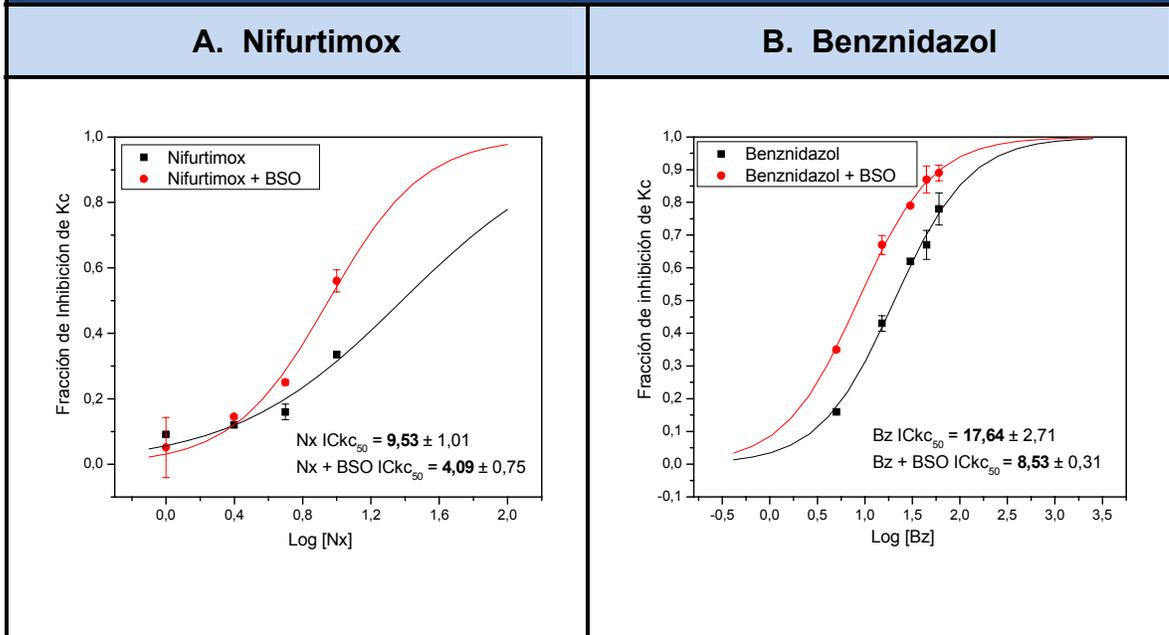


Figura 11 Efecto de Nx, Bz y su asociación con BSO sobre el crecimiento de epimastigotes de la cepa MF.



El crecimiento se determinó mediante nefelometría. (Ver materiales y métodos). Los valores de ICkC₅₀ se calcularon utilizando la herramienta Sigmoidal Fit / Dose-response del programa Originlab 7.5. Los valores están expresados en concentraciones μM y corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm D.S. Las drogas se agregaron el día cero.

Figura 12 Efecto de Nx, Bz y su asociación con BSO sobre el crecimiento de epimastigotes de la cepa Dm28c.

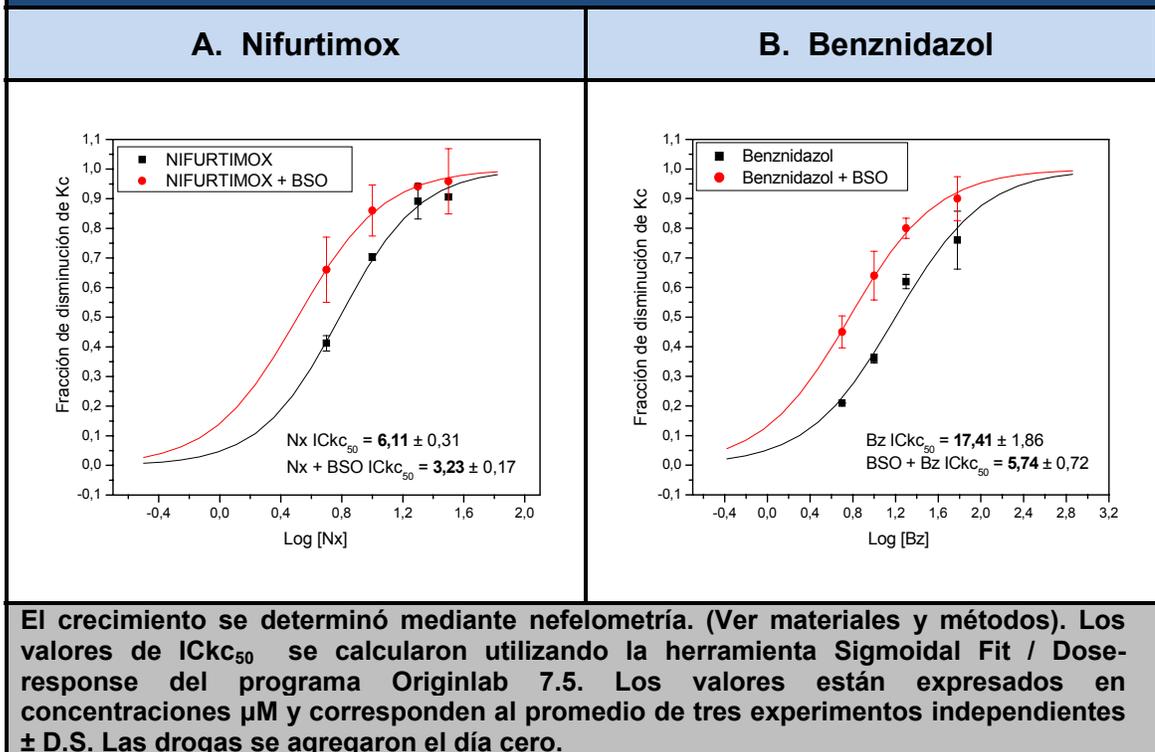


Tabla 2 Valores IC ₅₀ para Nx, Bz y su asociación con BSO sobre <i>T. cruzi</i> .				
Cepa de <i>T. cruzi</i>		LQ	MF	Dm 28c
Nx	IC ₅₀ /[μM]	8,09 ± 0,44	9,53	6,11 ± 0,31
	+ BSO IC ₅₀ /[μM]	3,13 ± 0,45	4,09	3,23 ± 0,17
Nx / Nx + BSO		2,6	2,3	1,9
Bz	IC ₅₀ /[μM]	19,16 ± 5,13	17,44 ± 1,86	17,64 ± 0,34
	+ BSO IC ₅₀ /[μM]	5,30 ± 2,82	5,74 ± 0,72	8,53 ± 0,31
Bz / Bz + BSO		3,6	3,1	2,1
El crecimiento se determinó mediante nefelometría. (Ver materiales y métodos). Los valores de IC ₅₀ se calcularon de acuerdo a lo explicado previamente, están expresados en concentraciones μM y corresponden al promedio de tres experimentos independientes ± D.S. Las distintas drogas se agregaron el día cero. Valores obtenidos de las figuras 10, 11 y 12.				

Determinación del efecto de drogas antichagásicas y su asociación con BSO sobre la viabilidad de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

El viabilidad de los parásitos en cultivos axénicos es un valioso indicador biológico, que puede ser estudiado con diversos métodos, tal como la reducción de sales de tetrazolium (MTT), la cual puede ser seguida por colorimetría del producto formado, formazán. Esta técnica permite también determinar el número de células vivas, ya que la formación e intensidad del formazán es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo.

Al igual que en el experimento anterior, se cultivaron 3×10^6 epimastigotes/mL de distintas cepas de *T. cruzi* incubándolas con distintas concentraciones de Bz o Nx asociadas o no a BSO 500 μ M. A partir del análisis de las absorbancias, como se describe en materiales y métodos, se graficaron los valores de constante de sobrevida (ks) obtenidos para cada una de las dosis estudiadas, y construyendo las curvas Dosis/Respuesta se calculó la concentración a la cual la constante de sobrevida disminuye en un 50% (**IC_{ks50}**) valores que se detallan en la tabla 3.

Este experimento es importante por cuanto los seguimientos por nefelometría no diferencian entre muerte celular y detención de la duplicación celular. La disminución en la viabilidad de los epimastigotes, evidenciada por el daño

mitocondrial que conlleva necesariamente a la muerte celular, explica que a altas concentraciones no se observe prácticamente ninguna actividad mitocondrial.

Del mismo modo que en el caso de la evaluación de kc, se observa que el efecto inhibitorio sobre ks de las drogas antichagásicas se ve fuertemente potenciado al asociarlas con BSO.

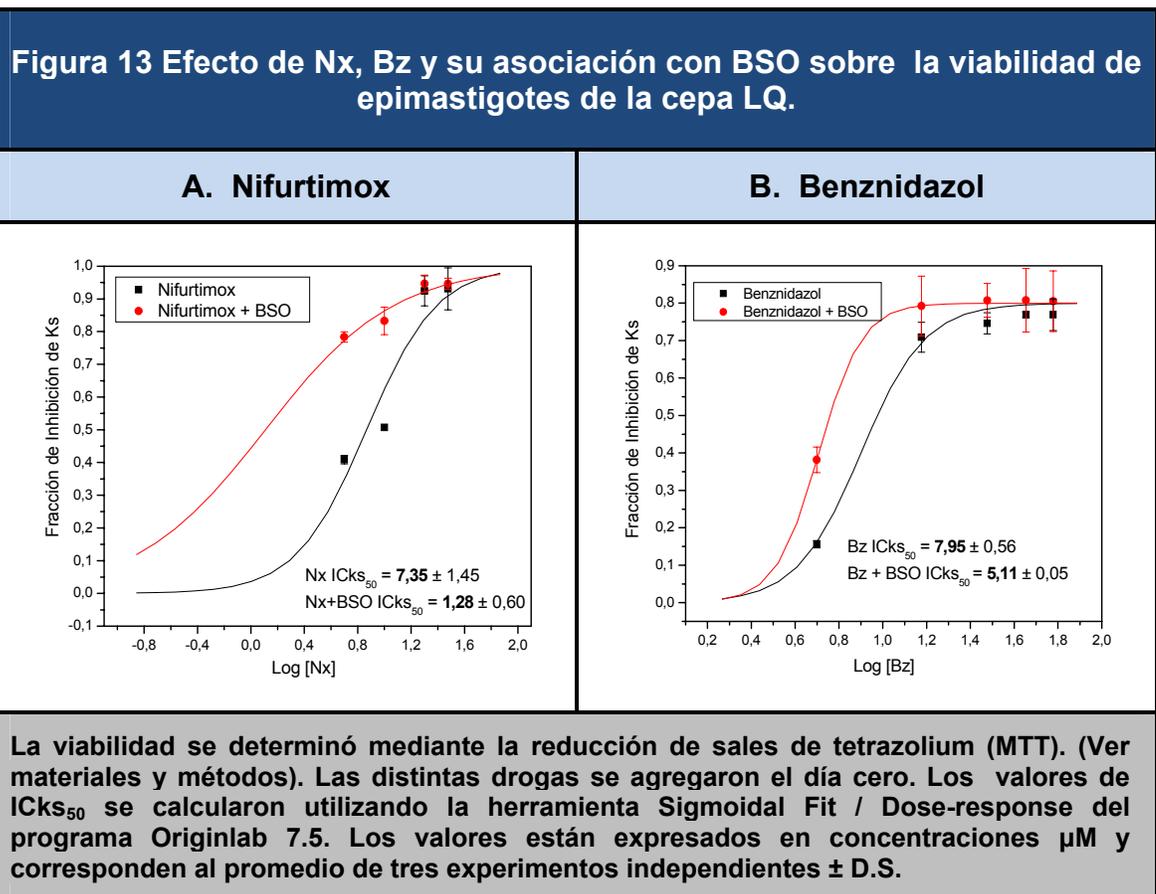
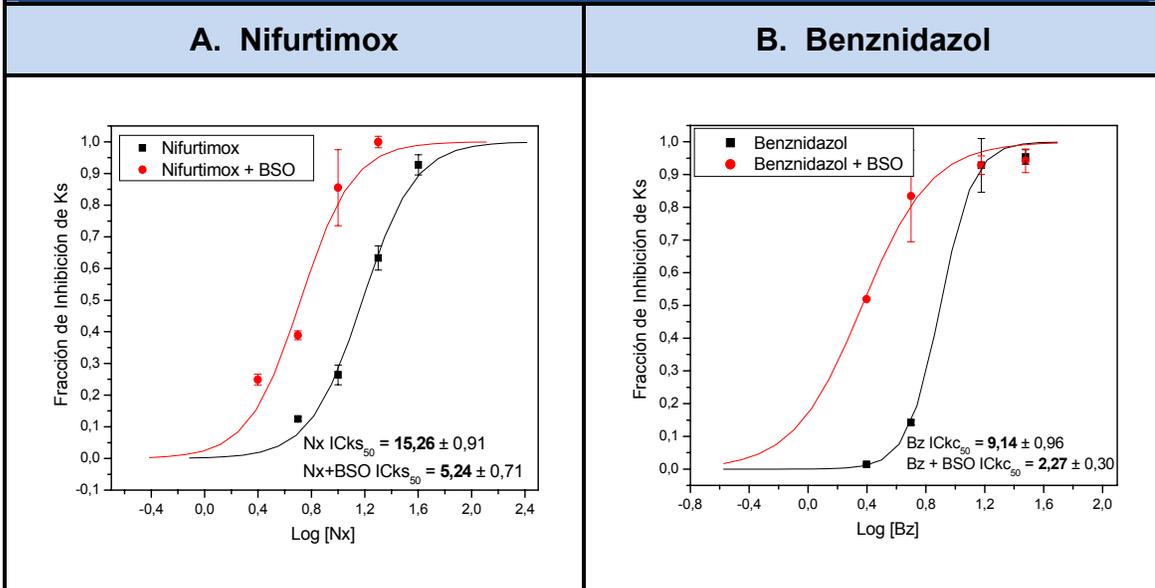
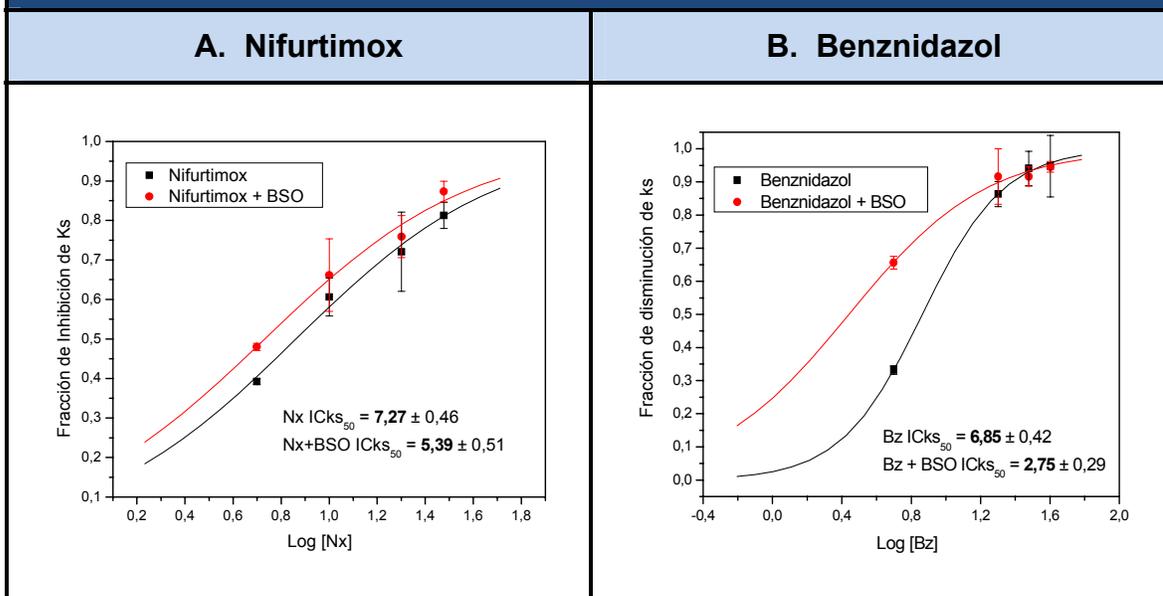


Figura 14 Efecto de Nx, Bz y su asociación con BSO sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa MF.



La viabilidad se determinó mediante la reducción de sales de tetrazolium (MTT). (Ver materiales y métodos). Los valores de ICK₅₀ se calcularon utilizando la herramienta Sigmoidal Fit / Dose-response del programa Originlab 7.5. Las distintas drogas se agregaron el día cero. Los valores están expresados en concentraciones μM y corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm D.S.

Figura 15 Efecto de Nx, Bz y su asociación con BSO sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa Dm28c.



La viabilidad se determinó mediante la reducción de sales de tetrazolium (MTT). (Ver materiales y métodos). Los valores de ICKs₅₀ se calcularon utilizando la herramienta Sigmoidal Fit / Dose-response del programa Originlab 7.5. Las distintas drogas se agregaron el día cero. Los valores de ICKs₅₀ están expresados en concentraciones μM y corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm D.S.

Tabla 3 Valores ICKs₅₀ para Nx, Bz y su asociación con BSO sobre *T. cruzi*

Cepa de <i>T. cruzi</i>		LQ	MF	Dm 28c
Nx	ICKs ₅₀ /[μM]	7,35 \pm 1,45	8,31 \pm 1,01	7,27 \pm 0,46
	+ BSO ICKs ₅₀ /[μM]	1,28 \pm 0,60	2,61 \pm 0,31	5,39 \pm 0,51
Nx / Nx + BSO		5,7	2,9	1,4
Bz	ICKs ₅₀ /[μM]	7,95 \pm 0,56	9,14 \pm 0,96	7,25 \pm 0,39
	+ BSO ICKs ₅₀ /[μM]	2,11 \pm 0,05	2,27 \pm 0,30	2,81 \pm 0,61
Bz / Bz + BSO		3,8	4,0	2,6

La viabilidad se determinó mediante la reducción de sales de tetrazolium (MTT). (Ver materiales y métodos). Las distintas drogas se agregaron el día cero. Los valores de ICKs₅₀ están expresados en concentraciones μM y corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm D.S. Valores obtenidos de las figuras 13, 14 y 15.

Efecto de Nifurtimox y Benznidazol y su asociación con BSO en células VERO infectadas con *Trypanosoma cruzi*.

La forma tripomastigota del parásito, penetra al torrente sanguíneo a través de una herida dejada por el triatomino al momento de alimentarse de la sangre del mamífero o a través de su mucosa conjuntival. El ciclo replicativo intracelular tarda de 3 a 5 días, luego de los cuales nuevos tripomastigotes son liberados al torrente sanguíneo del hospedero y diseminados en el cuerpo donde son capaces de infectar otros tejidos en sitios alejados de la invasión. Así, la capacidad de infectar y replicarse dentro de una variedad de tipos celulares es una característica esencial del ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* en el mamífero hospedero. (Burleigh, 2002).

Los tripomastigotes son capaces de infectar a la mayoría de las células nucleadas de mamífero (Burleigh, 2002) y establecer residencia dentro de su citoplasma diferenciándose en amastigotes. Esta forma intracelular del parásito presenta la facultad de multiplicarse por fisión binaria, repletando el citoplasma de la célula infectada con amastigotes que previo a la lisis de la célula se diferencian en tripomastigotes, que serán liberados al medio extracelular y podrán entonces infectar a otras células diseminando la infección.

Para evaluar el efecto de Nifurtimox, de Benznidazol y de su asociación con BSO sobre amastigotes intracelulares, se infectaron células VERO con tripomastigotes de las distintas cepas de *T. cruzi* como se describe en materiales y métodos y luego de 24 horas se adicionaron los distintos tratamientos.

Luego de 5 días de la infección se determinó el grado de ésta, mediante el recuento de amastigotes intracelulares por medio de visualización microscópica directa y por la determinación de proteínas totales del cultivo.

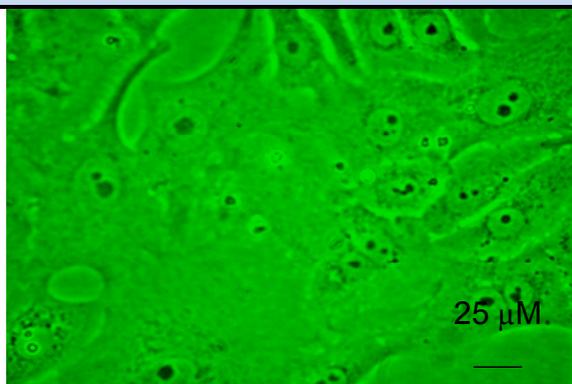
En la figura 16 se muestran las microfotografías representativas de células VERO infectadas con *T. Cruzii* de la cepa MF, luego de 5 días de infección y tratadas con Nx o Bz y su asociación de éstas a BSO.

En ella se puede observar claramente el efecto nulo de la BSO sobre la cantidad de amastigotes intracelulares. Por otra parte se observa que la disminución de los amastigotes causada por Nifurtimox se ve aumentada al asociar esta droga con BSO, un efecto similar se observa en células VERO infectadas tratadas con Bz y su respectiva asociación con BSO.

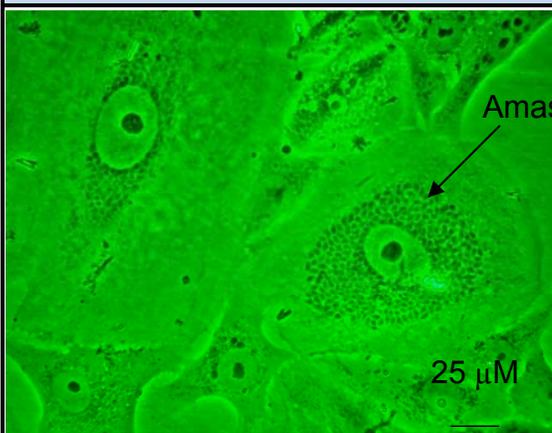
Resultados similares se obtuvieron en células VERO infectadas con las cepas LQ, Dm28c y Tulahuén de *T. cruzi* expuestas a los distintos tratamientos descritos.

Figura 16 Efecto de Nifurtimox y su asociación con BSO en células VERO infectadas con *Trypanosoma cruzi*.

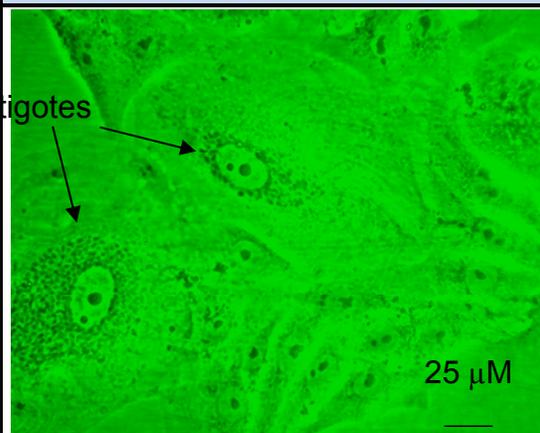
A. Células VERO



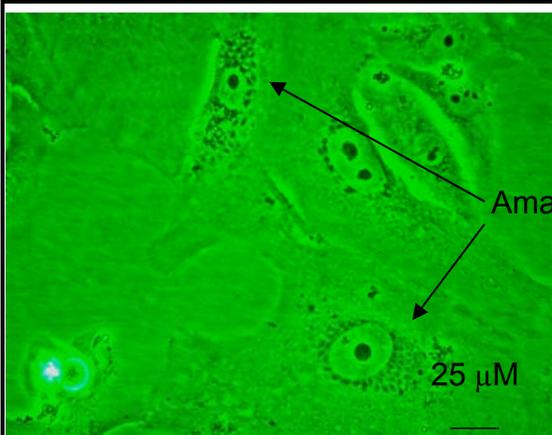
B. CONTROL



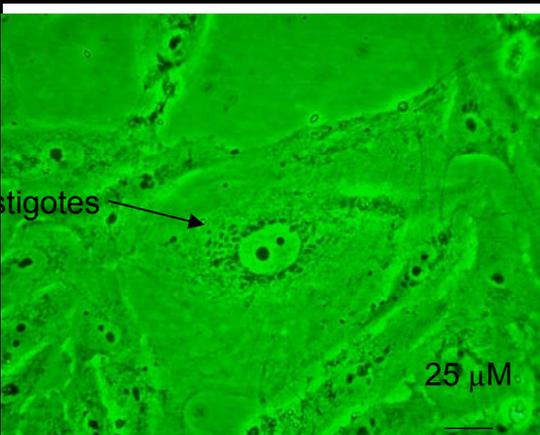
C. BSO



D. Nx 0,5 μM



E. Nx 0,5 μM + BSO



Microfotografía de células VERO infectadas con la cepa MF de *T. cruzi*, luego de 120 horas de infección. A.- Células VERO sin infectar. B.- Células VERO infectadas. C.- Células VERO infectadas más BSO 25 μM. D.- Células VERO infectadas tratadas con Nifurtimox 0,5 μM. E.- Células VERO infectadas, tratadas con Nifurtimox 0,5 μM más BSO 25 μM.

En 1998, Cazzulo y cols, definieron el índice endocítico como el porcentaje de células infectadas, multiplicado por el promedio de amastigotes intracelulares, como un indicador del efecto de drogas utilizadas en modelos *in vitro* de la enfermedad de Chagas.

A modo de evaluar el efecto tripanocida de distintas concentraciones de Nifurtimox y del Benznidazol y de su asociación con BSO se infectaron células VERO con distintas cepas de *T. cruzi* y luego de 4 días de tratamiento se evaluó el índice endocítico.

En las figuras 17 a la 20 se presentan las curvas dosis-respuesta del efecto tripanocida de Nx, Bz y de su asociación con BSO en células VERO infectadas con distintas cepas de *T. cruzi*.

En la tabla 4 se resumen los valores de IC₅₀ para cada droga y su asociación con BSO. Tanto en las figuras como en la Tabla se puede apreciar claramente la potenciación del efecto tripanocida de Nifurtimox y Benznidazol al asociarlos con BSO.

Figura 17 Efecto Nx, Bz y su asociación con BSO sobre el índice endocítico en células VERO infectadas con la cepa MF de *Trypanosoma cruzi*.

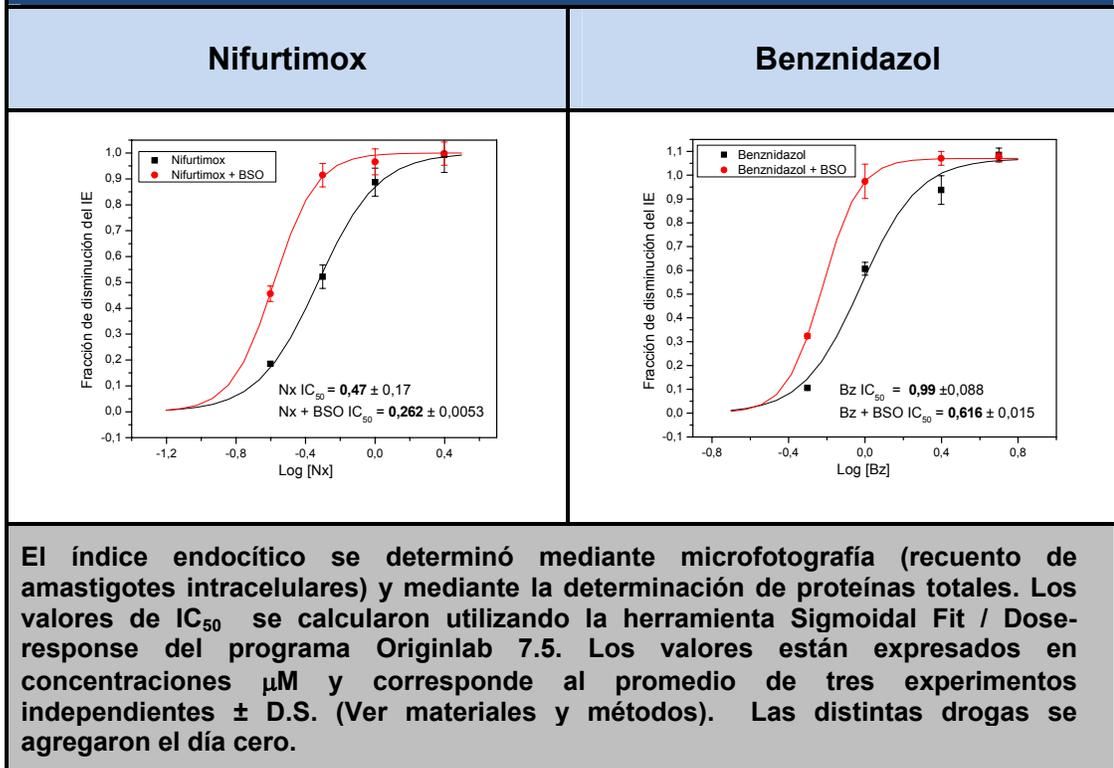


Figura 18 Efecto Nx, Bz y su asociación con BSO sobre el índice endocítico en células VERO infectadas con la cepa LQ de *Trypanosoma cruzi*.

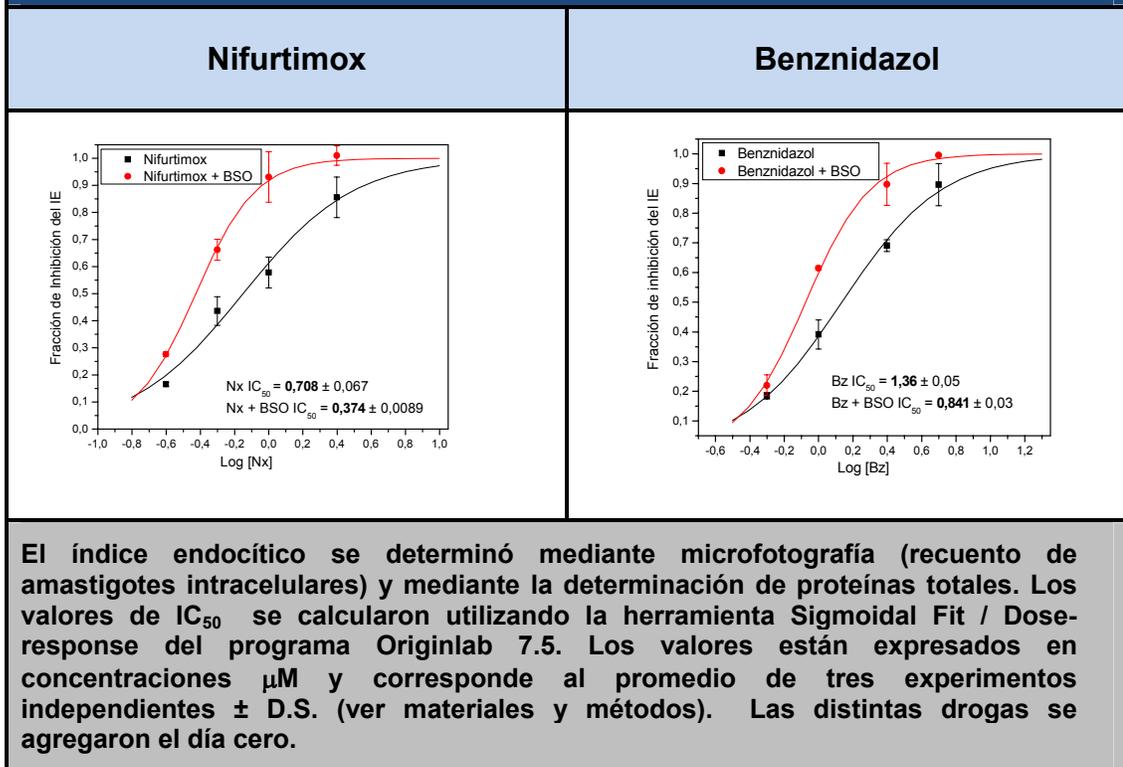
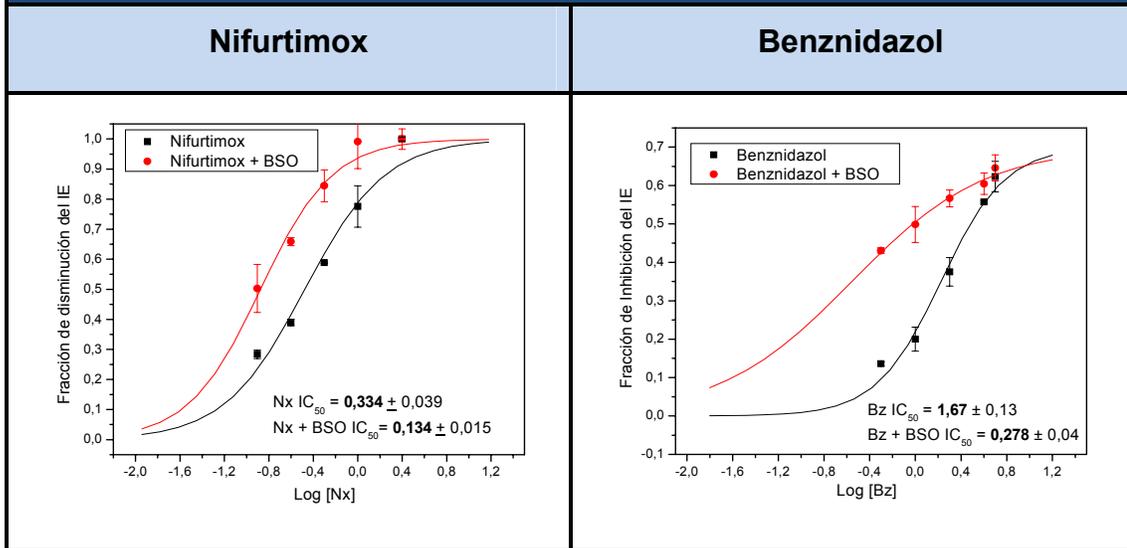
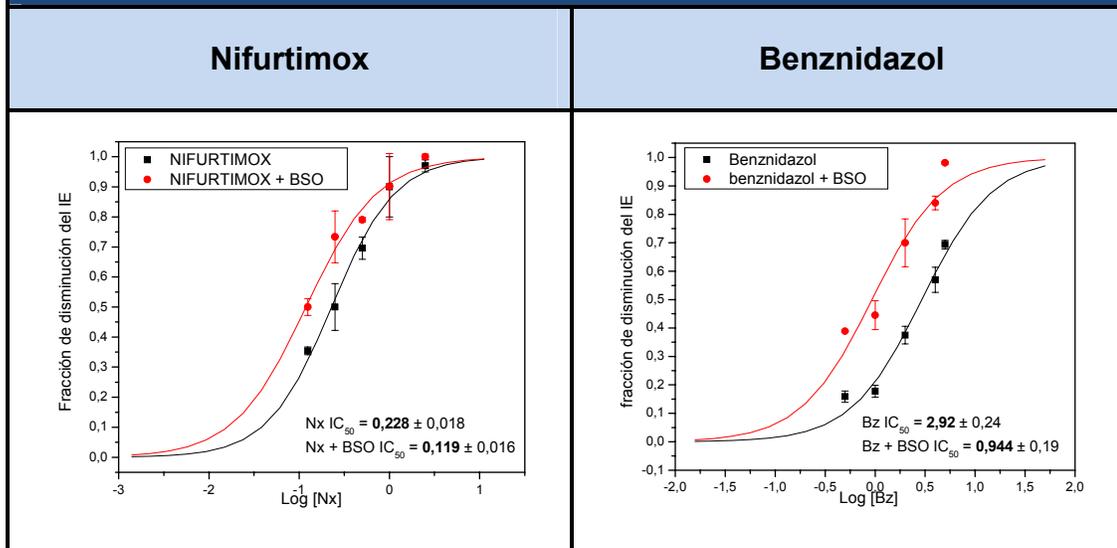


Figura 19 Efecto Nx, Bz y su asociación con BSO sobre el índice endocítico en células VERO infectadas con la cepa Tuluahuén de *Trypanosoma cruzi*.



El índice endocítico se determinó mediante microfotografía (recuento de amastigotes intracelulares) y mediante la determinación de proteínas totales. Los valores de IC₅₀ se calcularon utilizando la herramienta Sigmoidal Fit / Dose-response del programa Originlab 7.5. Los valores están expresados en concentraciones μM y corresponde al promedio de tres experimentos independientes \pm D.S. (ver materiales y métodos). Las distintas drogas se agregaron el día cero.

Figura 20 Efecto Nx, Bz y su asociación con BSO sobre el índice endocítico en células VERO infectadas con la cepa Dm28c de *Trypanosoma cruzi*.



El índice endocítico se determinó mediante microfotografía (recuento de amastigotes intracelulares) y mediante la determinación de proteínas totales. Los valores de IC_{50} se calcularon utilizando la herramienta Sigmoidal Fit / Dose-response del programa Originlab 7.5. Los valores están expresados en concentraciones μM y corresponde al promedio de tres experimentos independientes \pm D.S. (ver materiales y métodos). Las distintas drogas se agregaron el día cero.

Tabla 4 Valores IC_{50} para Nx, Bz y su asociación con BSO sobre *T. cruzi* en células VERO infectadas.

Cepa de <i>T. cruzi</i>		MF	LQ	Tulahuén	Dm 28c
Nx	$IC_{50}/[\mu M]$	$0,47 \pm 0,04$	$0,71 \pm 0,07$	$0,33 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,02$
	+ BSO $IC_{50}/[\mu M]$	$0,26 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,02$
Nx / Nx + BSO		1,8	1,9	2,5	1,9
Bz	$IC_{50}/[\mu M]$	$0,99 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,06$	$1,67 \pm 0,13$	$2,92 \pm 0,24$
	+ BSO $IC_{50}/[\mu M]$	$0,62 \pm 0,01$	$0,84 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,19$
Bz / Bz + BSO		1,6	1,6	5,9	3,1

El índice endocítico se determinó mediante microfotografía (recuento de amastigotes intracelulares) y mediante la determinación de proteínas totales. Los valores de IC_{50} se calcularon utilizando la herramienta Sigmoidal Fit / Dose-response del programa Originlab 7.5. Los valores están expresados en concentraciones μM y corresponde al promedio de tres experimentos independientes \pm D.S. (ver materiales y métodos). Las distintas drogas se agregaron el día cero. Valores obtenidos de las figuras 14 a la 17.

Sobrevida de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Efecto de Nifurtimox, Benznidazol y su combinación con BSO.

La forma tripomastigota constituye la forma infectiva del parásito y se puede observar su presencia en la sangre de pacientes infectados con *T. cruzi*, en este estado es capaz de infectar otras células y diseminar la infección. En la tabla 5 y 6 se muestra la el efecto citotóxico de Nifurtimox, Benznidazol y su asociación con BSO sobre tripomastigotes de la cepa MF de *T. cruzi*. En ella podemos observar claramente que el efecto citotóxico de ambas drogas de ve fuertemente potenciado al asociarlas con BSO.

En la figura 21 se muestran la curvas dosis/respuesta del efecto tripanocida de Nx, Bz y su asociación con BSO sobre tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa MF, observándose una potenciación del valor IC₅₀ para Nx de un 60 % al asociarlo con BSO (7,68 µM v/s 3,01 µM respectivamente). Del mismo modo se observa la potenciación del valor de IC₅₀ para Bz de un 88% al asociarlo con BSO (33,07 µM v/s 3,84 µM respectivamente).

Tabla 5 Efecto citotóxico de Nifurtimox y su asociación con BSO sobre tripomastigotes de la cepa MF.

Concentración / μM	Nifurtimox % de parásitos viables	Nifurtimox + BSO 500 μM % de parásitos viables
0	100 \pm 7	100 \pm 10
2	97 \pm 6	73 \pm 8
4	88 \pm 6	33 \pm 18
6	73 \pm 12	16 \pm 12
8	45 \pm 15	11 \pm 11

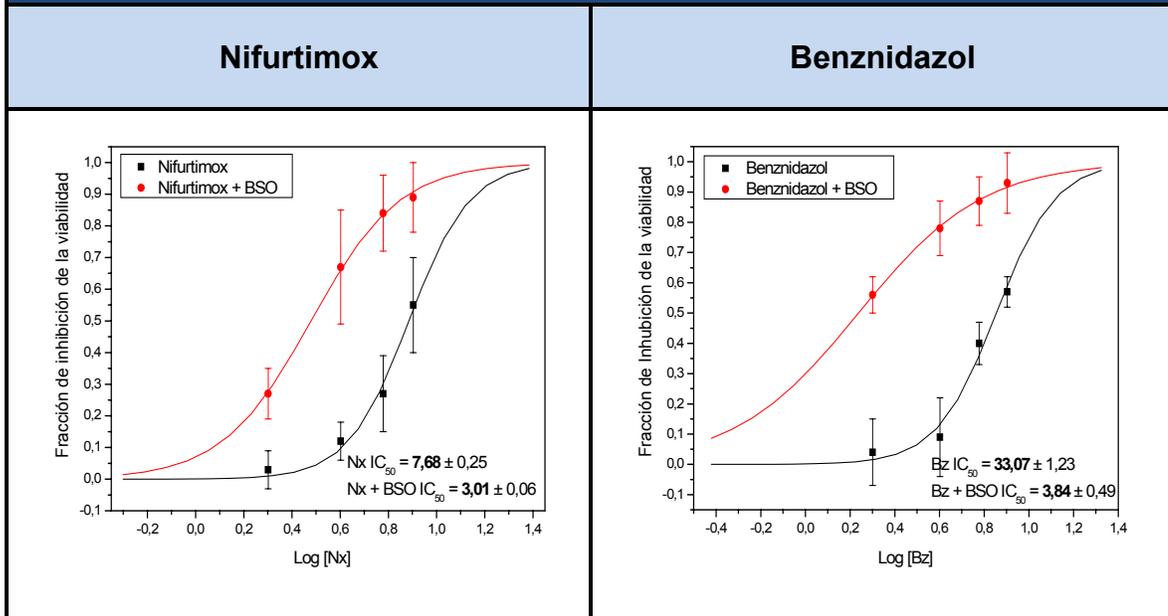
El 100 % de parásitos viables corresponde a la diferencia de absorbancia medida entre 570-nm y 690-nm/mg de proteína en el ensayo de MTT de los tripomastigotes que no fueron expuestos a ningún tratamiento. (ver materiales y métodos). Las distintas drogas se agregaron el día cero.

Tabla 6 Efecto citotóxico de Benznidazol y su asociación con BSO sobre tripomastigotes de la cepa MF.

Concentración / μM	Benznidazol % de parásitos viables	Benznidazol + BSO 500 μM % de parásitos viables
0	100 \pm 11	100 \pm 5
5	96 \pm 11	44 \pm 6
10	91 \pm 13	22 \pm 9
25	60 \pm 7	13 \pm 8
40	43 \pm 5	7 \pm 10

El 100 % de parásitos viables corresponde a la diferencia de absorbancia medida entre 570-nm y 690-nm/mg de proteína en el ensayo de MTT de los tripomastigotes que no fueron expuestos a ningún tratamiento. (Ver materiales y métodos). Las distintas drogas se agregaron el día cero.

Figura 21 Efecto Nx, Bz y su asociación con BSO sobre el la viabilidad de tripomastigotes de la cepa MF.



Los valores de IC₅₀ corresponden a la concentración necesaria para disminuir en un 50% la viabilidad de tripomastigotes de *T. cruzi*. Los valores de IC₅₀ se calcularon utilizando la herramienta Sigmoidal Fit / Dose-response del programa Originlab 7.5. Las distintas drogas se agregaron el día cero. Los valores de IC₅₀ están expresados en concentraciones μ M y corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm DS. Ver materiales y métodos. Valores obtenidos de las tablas 6 y 7.

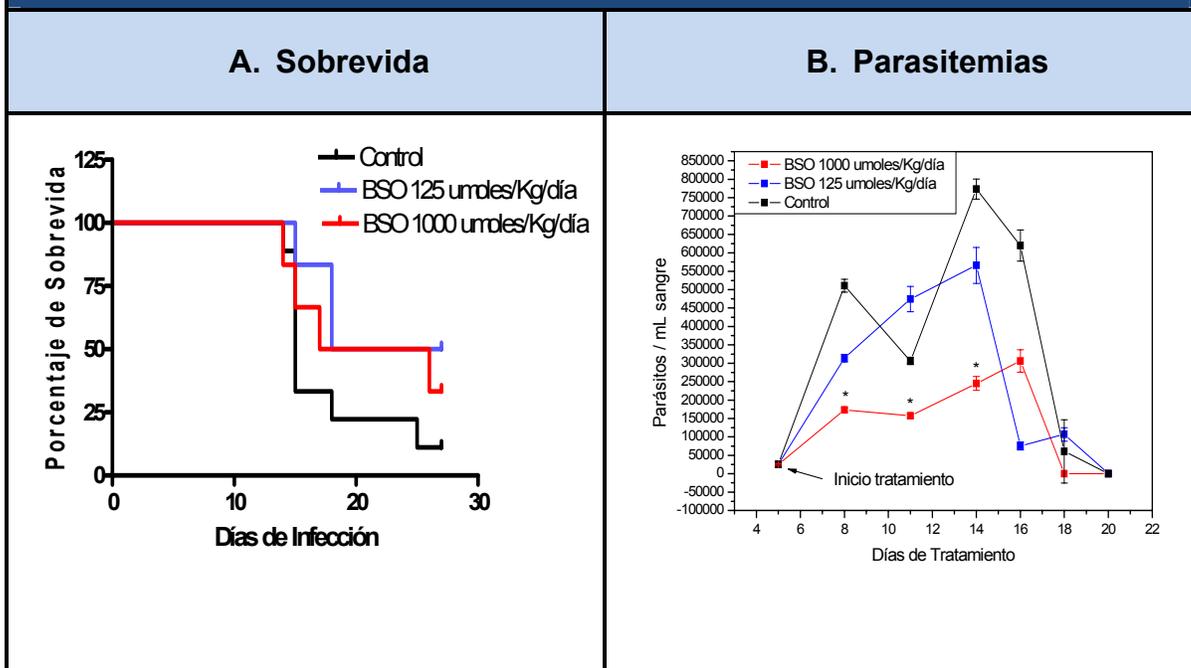
ESTUDIOS *IN VIVO*

Efecto de BSO en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.

Para evaluar el efecto *in vivo* de BSO, se infectaron ratones de la cepa BALB/c con 30.000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa DM28c de *T.cruzi*. Las dosis utilizadas fueron: 125 y 1000 $\mu\text{moles/Kg/día}$. La figura 22-A muestra el análisis de sobrevida comparativo entre ambos grupos respecto del control según el método de Kaplan-Meier. En esta figura se puede observar un 100% de sobrevida hasta el día 13, luego esta disminuye diferencialmente para los grupos tratados con BSO y para el grupo control. Esta diferencia no es estadísticamente significativa por el análisis logrank para ninguno de los grupos tratados, $p > 0.05$

Del mismo modo, se muestra la evolución en el tiempo de la parasitemia de los grupos tratados con BSO respecto del control (Figura 22-B), en esta figura se puede observar una diferencia significativa entre el grupo tratado con la dosis de 1000 $\mu\text{moles/Kg/día}$ y el grupo control, mediante análisis de ANOVA de una vía test Tukey, $p = 0,0139$. La dosis de 125 $\mu\text{moles/Kg/día}$ no mostró diferencias significativas respecto del control, $p = 0,4805$. A pesar de que el grupo tratado con la dosis mas alta de BSO presentó diferencias significativas respecto del control, esta diferencia no se correlaciona estadísticamente con la sobrevida.

Figura 22 Efecto de BSO en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c



Sobrevida y parasitemias de ratones BALB/c infectados con la cepa DM28c de *T. cruzi*, tratados con BSO. Los ratones se infectaron con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi* y se le administraron dosis de BSO 125 $\mu\text{moles/Kg/día}$ y 1000 $\mu\text{moles/Kg/día}$, el grupo control recibió H_2O , 200 μL por vía intraperitoneal administrados según materiales y métodos. La sobrevida fue evaluada diariamente. No se observan diferencias significativas comparadas con el control. BSO 125 $\mu\text{moles/Kg/día}$ $p=0,0749$; BSO 1000 $\mu\text{moles/Kg/día}$ $p=0,3022$, según el test logrank. Respecto de las parasitemias, se observan diferencias significativas comparadas con el control a dosis de 1000 $\mu\text{moles/Kg/día}$, a lo largo de todo el experimento, $p=0,01639$ en ANOVA de una vía, test Tukey.

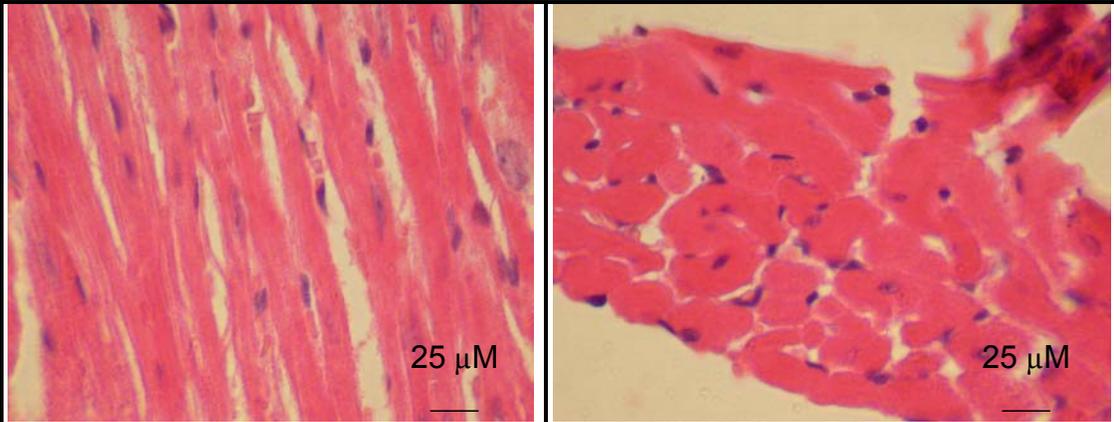
Los animales que no sobrevivieron, fueron sometidos a estudios histopatológicos de tejido cardíaco para poder correlacionar la sobrevida y/o parasitemia con la aparición de miocarditis, causa característica de muerte mediada por infección aguda de *Trypanosoma cruzi* (Castro y cols., 2006).

En la figura 23 se muestran las microfotografías de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina de miocardio de ratones sanos, ratones infectados con *T. cruzi* y ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con BSO.

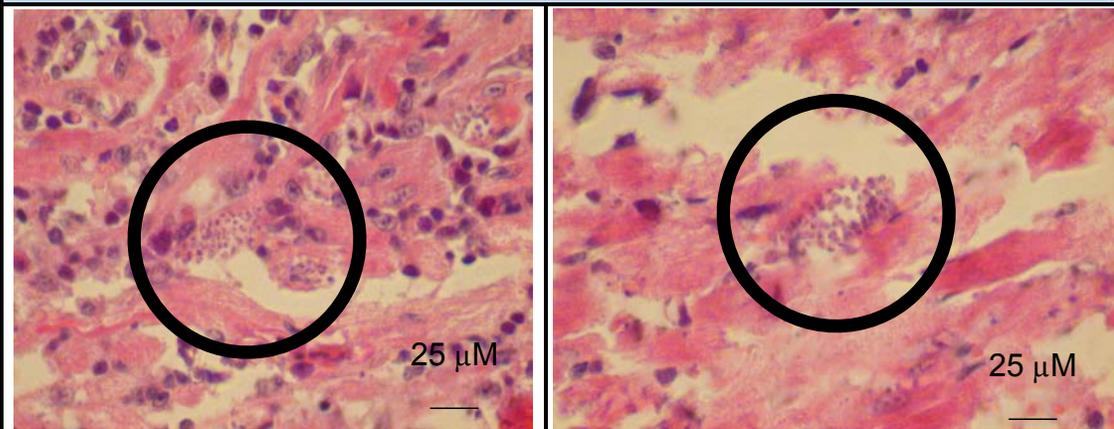
En esta figura podemos observar que mediado por la infección se observa la aparición de nidos de amastigotes (destacados en la figura) y de una gran cantidad de infiltrado inflamatorio, situación que tiende a disminuir por efecto de BSO. Al igual que lo observado con respecto a las parasitemias esta disminución del efecto inflamatorio en el corazón no se correlaciona con un aumento de la sobrevida de los animales.

Figura 23 Efecto de BSO en miocardio de ratones BALB/C infectados con *Trypanosoma cruzi*

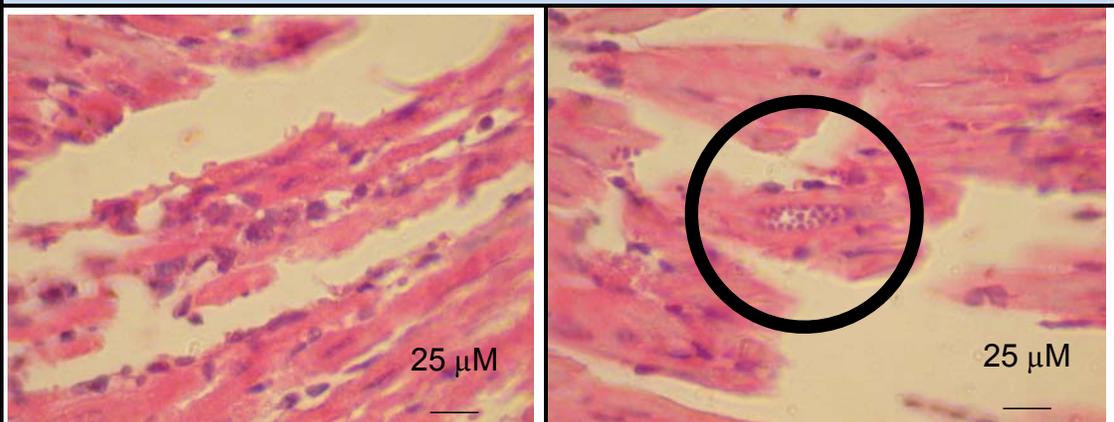
A. Ratón Sano



B. Ratón Infectado



C. Ratón tratado con BSO

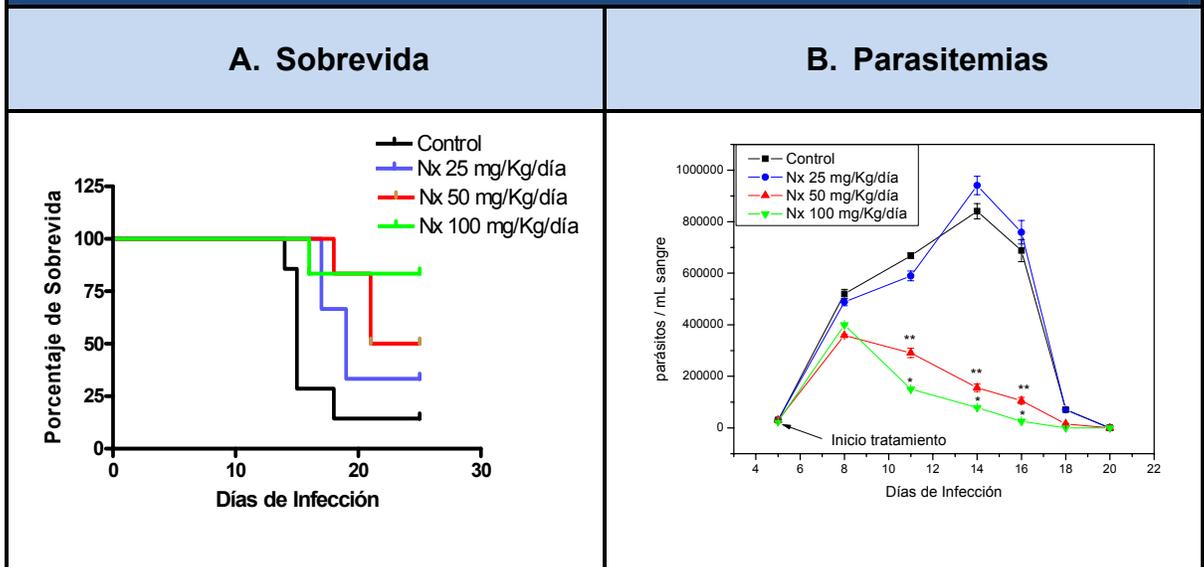


Microfotografías de cortes histológicos de miocardio de ratones BALB/c teñidos con hematoxilina-eosina.

Efecto de Nifurtimox y su asociación con BSO sobre ratones BALB/c, infectados con *T. cruzi*, cepa DM28c.

Para estudiar el efecto *in vivo* de de Nifurtimox y su asociación con BSO, se infectaron ratones de la cepa BALB/c con 30.000 tripomastigotes sanguíneos, cepa DM28c de *T. cruzi* y se dividieron aleatoriamente en grupos de 6 animales cada uno. Luego de 5 días de infección, donde se observaron parásitos en sangre, se administraron los tratamientos con Nifurtimox a dosis de 25 y 50 mg/Kg/día y sus respectivas asociaciones con BSO 1000 μ moles/Kg/día, además de la dosis efectiva reportada en la literatura de 100 mg/Kg/día utilizada como control positivo. La figura 24-A muestra los análisis de sobrevivencia comparativo en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, y tratados solamente con Nifurtimox, en ella podemos observar que a dosis de 25 y 50 mg/Kg/día no hay una diferencia significativa por el análisis logrank respecto del control, situación no observada a dosis de 100 mg/Kg/día los que concuerda con datos presentes en la literatura (Urbina y cols., 2004). La figura 24-B muestra la evolución de la parasitemia en el tiempo de los grupos tratados con Nifurtimox respecto del control, en ella se observa que no hay diferencias significativas entre el grupo tratado con Nx 25 μ moles/Kg/día y el grupo control, pero si se observan con el grupo tratado con 1000 μ moles/Kg/día, sin embargo esta diferencia en parasitemia no se refleja en una diferencia con la sobrevivencia.

Figura 24 Efecto de Nifurtimox sobre ratones BALB/C infectados con *Trypanosoma cruzi*

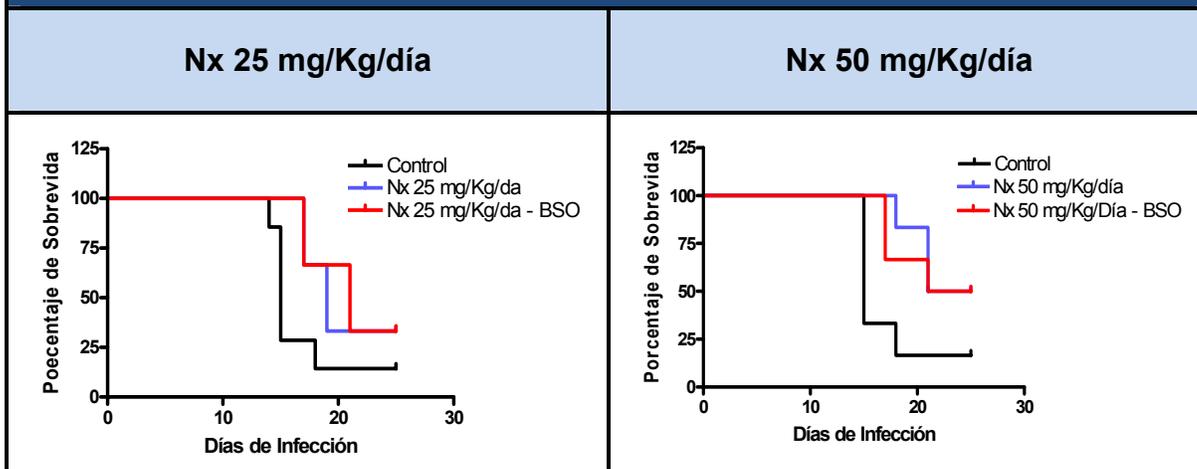


Sobrevida y parasitemias de ratones BALB/c infectados con la cepa DM28c de *T. cruzi*, tratados con Nifurtimox. Los ratones se infectaron con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi* y luego de cinco días comenzaron a ser tratados con Nx 25 mg/Kg/Día, 50 mg/Kg/Día 100 mg/Kg/Día administrados según materiales y métodos. La mortalidad fue evaluada diariamente. Se observan diferencias significativas solamente para el grupo de mayor dosis, $p=0.0145$, a dosis de 25 mg/Kg/Día y 50 mg/Kg/Día los valores de p fueron 0,0930 y 0,0546 respectivamente según el test logrank. Respecto de las parasitemias, se observan diferencias significativas comparadas con el control a dosis de 50 y 100 mg/Kg/día de Nx a lo largo de todo el experimento, $p=0,01160$ y $0,01140$ respectivamente en análisis de ANOVA de una vía, test Tukey.

Dado que a las dosis de 25 y 50 mg/Kg/día de Nifurtimox no se observaron diferencias significativas en la sobrevida respecto del grupo control, estas dosis se asociaron a 1000 μ moles/Kg/día de BSO. En la Figura 25 se observan los análisis de sobrevida de ratones BALB/c infectados con *T.cruzi* y tratados con Nifurtimox a las dosis mencionadas en asociación a BSO 1000 μ moles/Kg/día, en ella podemos observar que la asociación de estos fármacos no implica un aumento significativo en la sobrevida de los ratones si lo comparamos al control o al grupo tratado solamente con nifurtimox

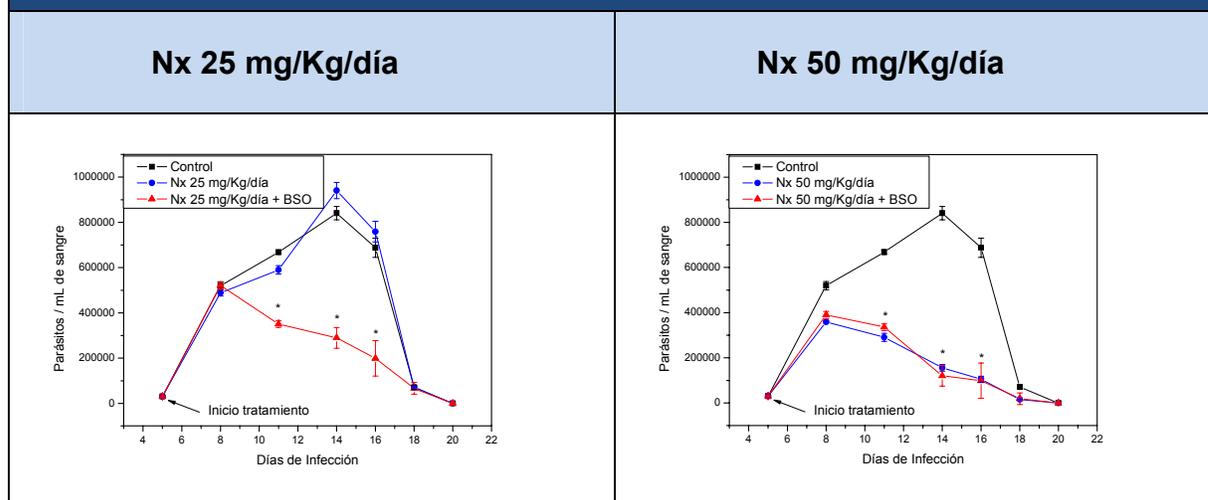
En la figura 26, se muestran la evolución de la parasitemia en el tiempo de los grupos tratados con Nx 25 y 50 mg/Kg/día y su asociación con BSO 1000 μ moles/Kg/día respecto del control, en ella podemos observar para la dosis de 25 mg/kg/día una disminución significativa de la parasitemia del grupo tratado con la asociación de drogas respecto del grupo control y respecto del grupo tratado con la droga sin asociar, no obstante a ello, este dato no se correlaciona con los datos de sobrevida de estos animales (Figura 25). Por otra parte, tanto la dosis de 50 mg/Kg/día de Nifurtimox y su asociación con BSO 1000 μ moles/Kg/día presentan una disminución significativa de la parasitemia durante el período estudiado, comparado con el grupo control sin embargo no existe diferencia estadística al realizar el análisis entre estas dosificaciones.

Figura 25 Análisis de sobrevivencia de ratones BALB/C infectados con *Trypanosoma cruzi* y tratados con Nifurtimox asociado a BSO.



Sobrevivencia de ratones BALB/c infectados con la cepa DM28c de *T. cruzi*, tratados con con la asociación Nifurtimox/BSO. Los ratones se infectaron con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*. Luego de cinco días de infección, los animales recibieron Nx 25 o 50 mg/Kg/Día y Nx 25 o 50 mg/Kg/Día asociado a BSO 1000 μ moles/Kg/día. Nifurtimox se administró por vía oral y BSO por vía intraperitoneal según materiales y métodos. La mortalidad fue evaluada diariamente. No se observaron diferencias significativas entre los grupos que recibieron la asociación comparadas con el control ni con sus respectivas dosis sin asociar, $p > 0,05$ en todos los casos según el test logrank.

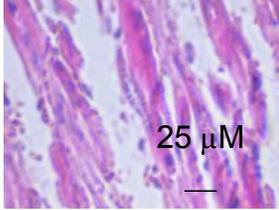
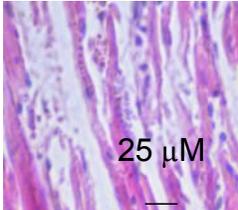
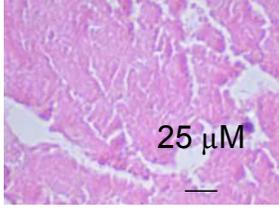
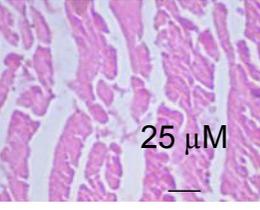
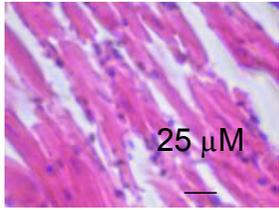
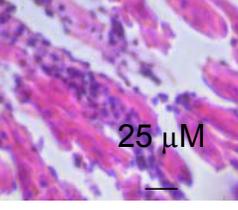
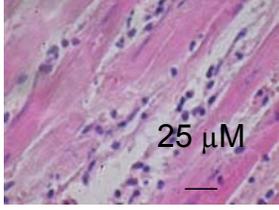
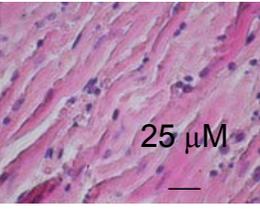
Figura 26 Efecto de Nifurtimox y su asociación con BSO sobre parasitemias en ratones infectados con *T. cruzi*



Las parasitemias se evaluaron por conteo bajo microscopio según materiales y métodos, se observan diferencias significativas entre el grupo que recibe 25 mg/kg/día asociado a BSO y el control, $p= 0,0228$ en análisis de ANOVA de una vía, test Tukey. A dosis de 50 mg/Kg/día se observan diferencias comparadas con el control con o sin la adición de BSO, sin embargo no se observa diferencia estadística entre ellas en análisis de ANOVA de una vía, test Tukey.

En la figura 27 se muestran las fotografías de cortes de miocardio teñidos con hematoxilina-eosina de ratones infectados con *T. cruzi* y ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con Nx y su asociación con BSO.

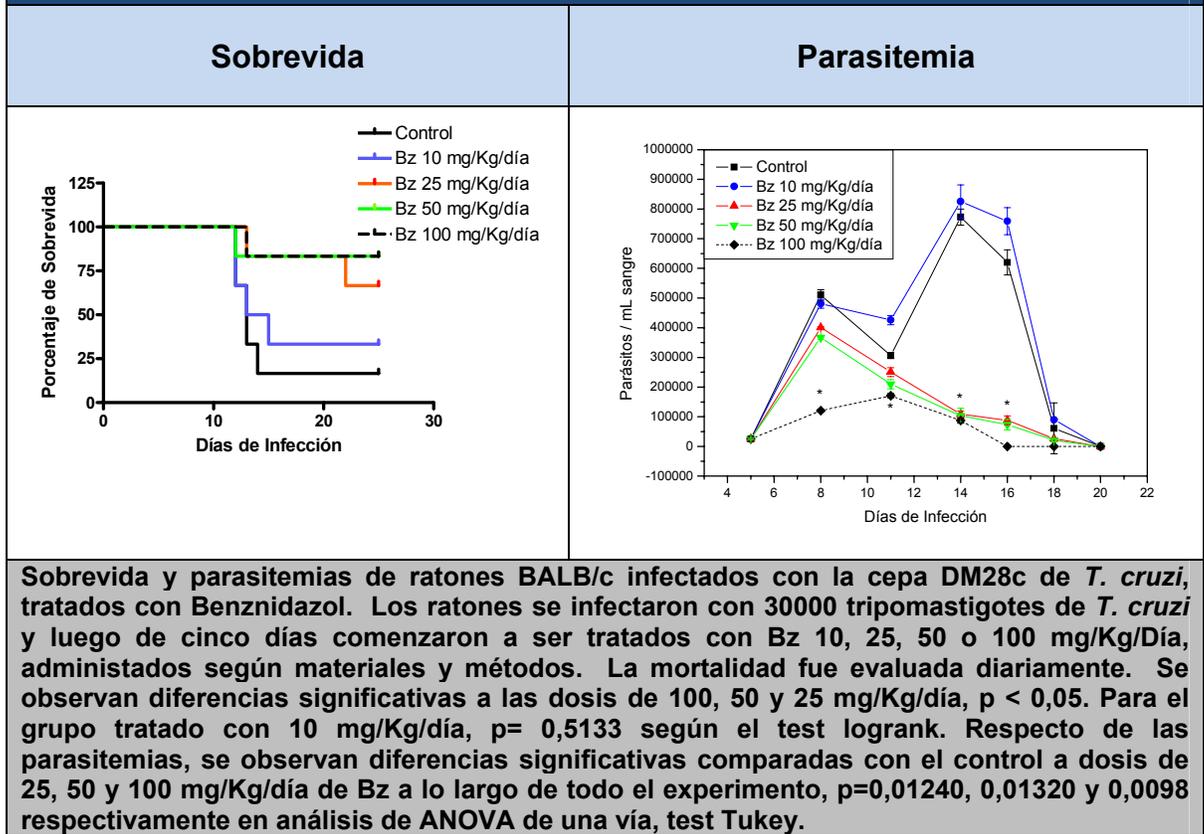
En esta figura se observan nidos de amastigotes (destacados en la figura) y una gran cantidad de infiltrado inflamatorio, situación que tiende a disminuir por efecto de Nifurtimox 100 mg/Kg/día observación que se correlaciona con la sobrevida. Esta disminución tanto en cantidad de amastigotes como en tejido inflamatorio, no se observa a la dosis de 25 mg/kg/día. Al asociar Nx 25 mg/Kg/día con BSO 1000 μ moles/Kg/día se observa una disminución tanto del infiltrado inflamatorio e incluso no se observan nidos de amastigotes, paradójicamente, esta situación no se correlaciona con la sobrevida de estos animales.

Figura 27 Efecto de NX su asociación con BSO sobre miocardio de ratones BALB/C infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i>			
CONTROL		Nx 100 mg/Kg/Día	
			
25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M
Nx 25 mg/Kg/día		Nx 25 mg/Kg/día + BSO 1000 μ moles/Kg/día	
			
25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M
Microfotografías de cortes histológicos de miocardio de ratones BALB/c teñidos con hematoxilina-eosina.			

Efecto de Benznidazol y su asociación con BSO sobre ratones BALB/c, infectados con *Trypanosoma cruzi*, cepa DM28c.

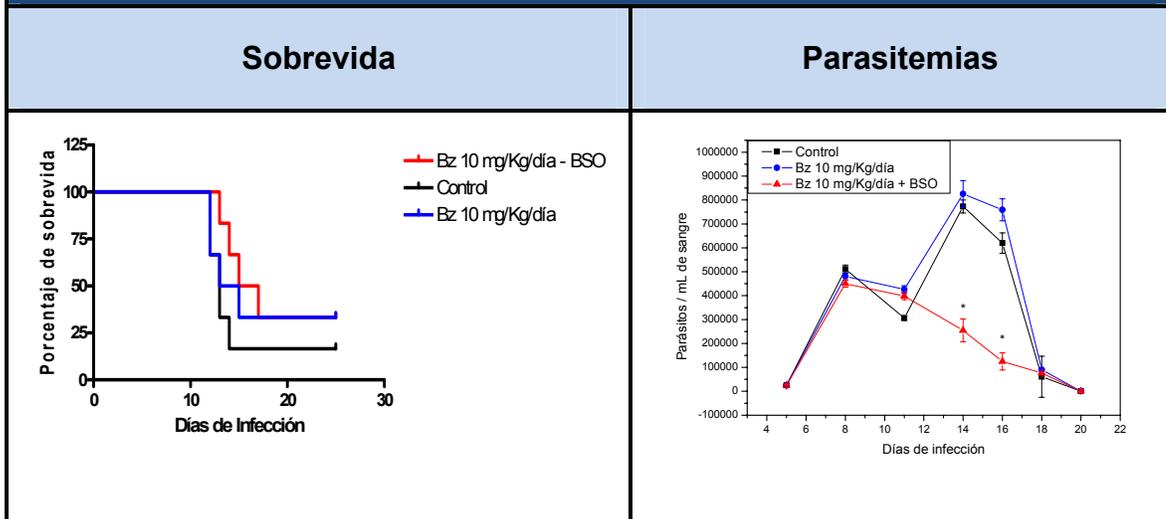
Del mismo modo que con Nifurtimox, para estudiar el efecto *in vivo* de Benznidazol y su asociación con BSO, se infectaron ratones de la cepa BALB/C con 30.000 tripomastigotes sanguíneos, cepa DM28c de *T. cruzi* y se dividieron aleatoriamente grupos de 6 animales cada uno. Luego de 5 días de infección, donde se observaron parásitos en sangre, se administraron los tratamientos con Benznidazol a dosis de 10, 25 y 50 mg/Kg/día y sus respectivas asociaciones con BSO 1000 μ moles/Kg/día, además de la dosis efectiva reportada en la literatura de 100 mg/Kg/día utilizada como control positivo. La figura 28 muestra análisis de sobrevivencia comparativo sobre ratones BALB/C infectados con *T. cruzi*, y tratados solamente con Benznidazol en ella podemos observar que a dosis de 10 mg/Kg/día no hay una diferencia significativa por el análisis logrank respecto del control, situación no observada a dosis de 25, 50 y 100 mg/Kg/día.

Figura 28 Efecto de Benznidazol sobre ratones BALB/c infectados con *Trypanosoma cruzi*



La Dosis de 10 mg/Kg/día de Benznidazol, se asoció a 1000 μ moles/Kg/día de BSO. En la Figura 29 se observan los análisis de supervivencia de ratones BALB/C infectados con *T. cruzi* y tratados con Benznidazol a esta dosis subefectiva asociada a BSO, en ella podemos observar que al asociar Benznidazol con BSO no existen diferencias significativas respecto del control ni con respecto al uso de Benznidazol sin asociar.

Figura 29 Análisis de sobrevida de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* y tratados con la asociación de Benznidazol mas BSO.



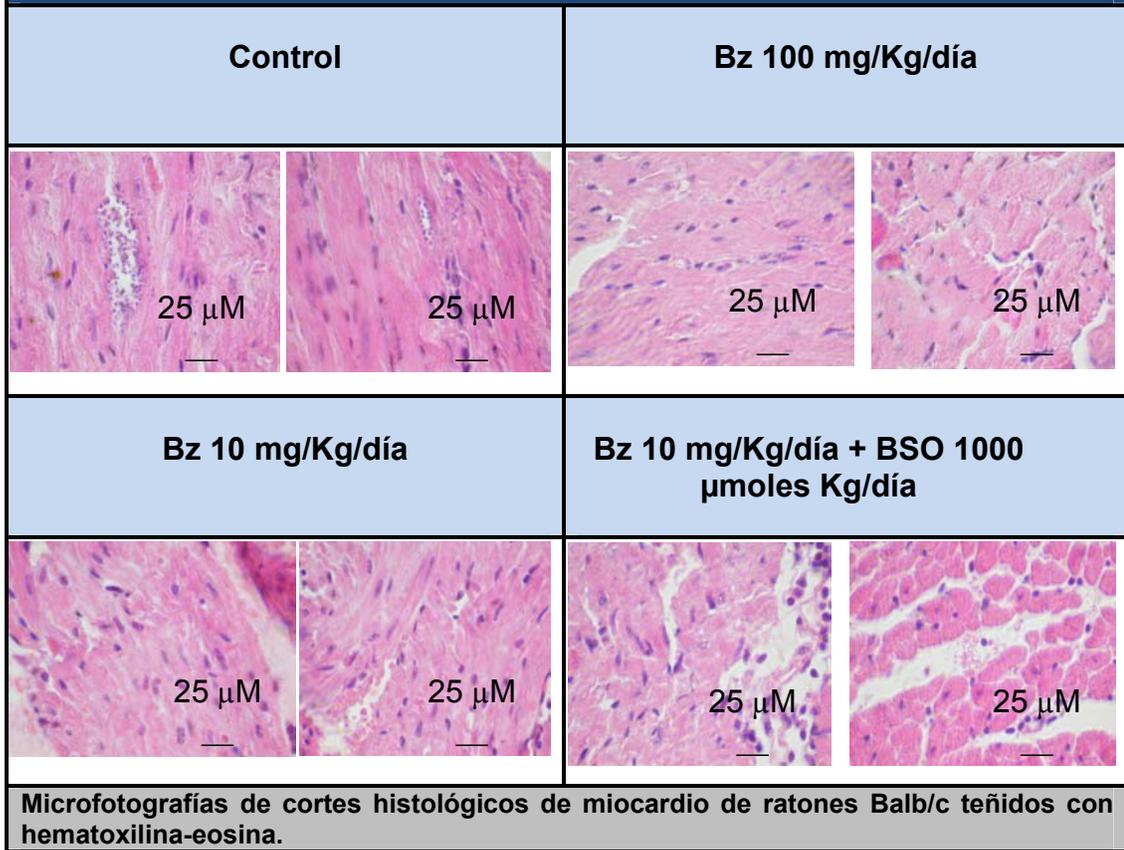
Sobrevida de ratones BALB/c infectados con la cepa DM28c de *T. cruzi*, tratados con la asociación Benznidazol/BSO. Los ratones se infectaron con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*. Luego de cinco días de infección, los animales recibieron Bz 10 mg/Kg/Día y Bz 10 mg/Kg/Día asociado a BSO 1000 μ moles/Kg/día. Bz se administró por vía oral y BSO por vía intraperitoneal según materiales y métodos. La mortalidad fue evaluada diariamente. No se observaron diferencias significativas entre los grupos que recibieron la asociación comparadas con el control ni con sus respectivas dosis sin asociar, $p > 0,05$ en todos los casos según el test logrank.

Las parasitemias se evaluaron por conteo bajo microscópio según materiales y métodos, se observan diferencias significativas entre el grupo que recibe 10 mg/kg/día d Bz asociado a BSO y el control, $p = 0,0358$ en análisis de ANOVA de una vía, test Tukey.

En la figura 30 se muestran las fotografías de cortes de miocardio de ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con Benznidazol y su asociación con BSO.

En esta figura podemos observar que mediado por la infección se observa la aparición de nidos de amastigotes (destacados en la figura) y de una gran cantidad de infiltrado inflamatorio, situación que tiende a disminuir por efecto de Benznidazol. Por otra parte, por efecto de Benznidazol a dosis de 10 mg/Kg/día, no se observan nidos de amastigotes pero queda en evidencia la presencia de infiltrado inflamatorio, situación observada también al asociar esta dosis con BSO. Al igual que lo observado con respecto a las parasitemias esta disminución del efecto inflamatorio en el corazón no se correlaciona con un aumento de la sobrevida de los animales.

Figura 30 Efecto de Bz su asociación con BSO sobre miocardio de ratones BALB/c infectados con *trypanosoma cruzi*



DISCUSIÓN

En América Latina, la enfermedad de Chagas constituye una de las mayores preocupaciones en materia de salud pública, siendo después de la malaria, la enfermedad ligada a vectores de mayor prevalencia y mortalidad (Atias, 1998; WHO, 2002).

Esta enfermedad puede ser prevenida si se implementan medidas de salud públicas orientadas a la erradicación del vector. De hecho, programas de control del vector basados en el uso de insecticidas han mostrado beneficios incuestionables, presentando abruptas disminuciones en infecciones por *T. cruzi* en poblaciones jóvenes viéndose esto reflejado en una disminución en la tasa de muerte durante los últimos treinta años. Sin embargo, dado el gran número de vectores capaces de transmitir la enfermedad, no se ha logrado un total control de la transmisión de la enfermedad mediada por artrópodos (Texeira, 2006). Es más, estudios recientes realizados en Chile, en la región Metropolitana, han demostrado el desarrollo extra y peridomiciliario de *Triatoma infestans*, principal insecto vector en nuestro país, lo que hace necesario un replanteamiento de los planes de control de este vector (Bacigalupo y cols., 2006).

Por otra parte, la erradicación se dificulta en países donde la detección en bancos de sangre no es sistemática, y por el aumento del fenómeno social

de la migración que incluye pacientes en fase latente o crónica de la enfermedad lo que facilita la transmisión vía sanguínea del parásito.

Por otra parte, la inhibición de la síntesis de GSH con BSO se ha usado como estrategia para revertir resistencia (Calvert, 1998) y potenciar el efecto antineoplásico de agentes como doxorubicina (Vanhoefler y cols., 1996), melfalán (Anderson y cols., 2000) o ciclofosfamida (Sipos y cols., 2001). En estudios de fase I (Bailey y cols., 1994; Bailey y cols., 1997; O'Dwyer y cols., 1996), usaron concentraciones plasmáticas de BSO entre 0,5 a 1 mM, reduciendo los niveles de GSH en células blancas a menos de un 20%.

En esta tesis reportamos que la BSO es capaz de disminuir eficazmente los niveles de GSH y TSH2 en todas las formas de *T. cruzi* (Figura 8). Lo que demuestra que la gamma-glutamilcistein sintetasa del parásito es inhibida por la BSO, dato que concuerda con experimentos realizados en *T. brucei* (Arrick, 1990). En esta tabla se observa que luego de 48 horas de incubación con BSO no se llega a una disminución total del contenido de GSH, esto se debe a la existencia de compartimentos intracelulares capaces de almacenar GSH (Griffith y Meister 1985).

Por otra parte, los estudios realizados en epimastigotes, forma replicativa de *T. cruzi*, nos indican que BSO presenta una baja toxicidad sobre el parásito afectando el crecimiento y la viabilidad de manera dosis dependiente, a concentraciones superiores a las necesarias para inhibir la síntesis de GSH

(Figura 8, Figura 9 y Tabla 1), situación que sugiere que el GSH no es indispensable para el crecimiento de epimastigotes.

En las figuras 10, 11, y 12, se muestran las curvas dosis respuestas del efecto de Nx y Bz y de sus asociaciones con BSO sobre el crecimiento de epimastigotes de distintas cepas en *T. cruzi*, claramente se observa un efecto potenciador de la BSO ya que a las dosis utilizadas para inhibir la síntesis de GSH, no se afecta el valor de la constante de crecimiento de los cultivos, pudiendo disminuir los valores de ICKc50 alrededor de 50 % (tabla 1).

Del mismo modo, y en forma simultánea, se estudió el efecto de las drogas antichagásicas y su asociación con BSO sobre la constante de viabilidad de cultivos de distintas cepas de epimastigotes de *T. cruzi*. (Figuras 13, 14 y 15) pudiendo observar nuevamente la potenciación del efecto de Nx o Bz por la asociación con BSO, datos resumidos en la tabla 3. La potenciación que se observa al comparar los valores de ICKs50 son algo mayores que si comparamos las curvas de crecimiento (aproximadamente 70% v/s 50% respectivamente). Esta situación se puede deber a diferencias en los tipos de mediciones ya que la nefelométrica mide solamente la presencia de parásitos, no siendo por ello, todos viables, diferencia que permite dilucidar los ensayos de viabilidad (Tabla 2 y Tabla 3).

Para analizar si este efecto potenciador se podía observar en un modelo *in vitro* de enfermedad Chagas como lo es el modelo de células VERO, se

estudió el efecto de Nx, Bz y sus asociaciones con BSO en cultivos de células VERO infectadas con distintas cepas de *T. cruzi*. Para medir este efecto se determinó el porcentaje de células infectadas, multiplicado por el promedio de amastigotes intracelulares, como un indicador del efecto de drogas utilizadas en modelos *in vitro* de la enfermedad de Chagas, este parámetro llamado índice endocítico fue descrito por Cazzulo y cols., en 1998. En las figuras 17, 18, 19 y 20, se muestran las curvas dosis-respuesta que relaciona el índice endocítico con las drogas antichagásicas y su asociación con BSO. En ellas podemos observar un efecto potenciador de la BSO ya que los valores de IC₅₀ para el índice endocítico disminuyen en promedio en más de un 50 % para todas las cepas estudiadas. Específicamente, se observa que los valores de IC₅₀ disminuyen aproximadamente en un 40% para ambas drogas en las cepas MF y LQ, y cerca de un 60% para Nx y un 80% para Bz para la cepa Tulahuén. Reportes anteriores han demostrado que el contenido de GSH y T(SH)₂ para esta cepa son menores que para el resto, lo cual podría explicar esta diferencia observada.(Maya y cols. 1997)

Como se puede observar en la figura 16C, la BSO no presenta efecto antichagásico en células VERO infectadas con *T. cruzi*. Además, la dosis de BSO utilizada (25 µM) no afecta la viabilidad de las células VERO, pero si inhibe efectivamente los niveles de GSH. Del mismo modo en células infectadas con *T. cruzi* y tratadas con BSO 25 µM se detectaron niveles muy

bajos de GSH comparados con el control y no se pudo detectar la presencia de T(SH)₂ lo que indica que la dosis utilizada efectivamente se inhibe la síntesis de T(SH)₂ en amastigotes intracelulares. Este hecho, junto con el nulo efecto de la BSO sobre el índice endocítico en células VERO infectadas, nos indican que ni el GSH ni el T(SH)₂ son indispensables para la multiplicación intracelular del parásito, pero si son factores fundamentales para la defensa contra radicales libres y/o agentes electrofílicos en células VERO.

La forma tripomastigota constituye la forma infectante del parásito y es la responsable de la infección en mamíferos, en la figura 21 se muestra el efecto de Nx y Bz y su asociación con BSO sobre la viabilidad de tripomastigotes de *T. cruzi*, en ella se observa un claro efecto potenciador del efecto tripanocida de Nx o Bz cuando se asocian con BSO, datos presentados en las tabla 5 y 6, hecho relevante ya que esta forma es la encargada de infectar al mamífero, de diseminar la infección al resto de tejidos del organismo y es la forma característica presente en la enfermedad de Chagas aguda (Castro y cols., 2006, Texeira 2006). Además se observa que la BSO a la dosis utilizada, efectivamente disminuye los niveles de GSH y T(SH)₂, sin afectar la viabilidad de los parásitos, lo que nos indica que GSH no es indispensable para la sobrevivencia de tripomastigotes de *T. cruzi*.

Se infiere de lo anterior, que la forma infectiva tripomastigota (Tabla 5 y 6) y la intracelular amastigota (Tabla 4) fueron más sensibles a la potenciación de Nifurtimox y Benznidazol asociado a BSO que la forma epimastigota. Una posible explicación para esta observación es que las formas tripo y amastigota contienen menos de la mitad de la concentración total de tioles que la forma epimastigota.

Por otra parte, Nifurtimox, Benznidazol y Butionina Sulfoximina disminuyen el contenido total de tioles por dos mecanismos distintos (Maya y cols., 1997; Maya y cols., 2003). Así, BSO inhibe la síntesis de GSH, mientras los metabolitos electrofílicos de Nx y Bz se conjugan con tioles libres. En ambas situaciones la concentración de GSH y T(SH)₂ se ven disminuidas facilitando la acción citotóxica de radicales libres o metabolitos electrofílicos.

Existen antecedentes en la literatura que demuestran que ratones infectados con *Trypanosoma brucei* fueron curados utilizando solamente BSO (Arrick y cols., 1981), Por otra parte, al tratar con BSO a macrófagos infectados con *Leishmania donovani* se observó que los macrófagos recuperaban su capacidad tripanocida con la consecuente desaparición de la infección (Kapoor y cols., 2000). Estos antecedentes, abren la posibilidad de determinar un posible efecto tripanocida de la BSO sobre *Trypanosoma cruzi*. En los estudios presentados en esta tesis, no observamos este efecto de la BSO en células VERO (Figura 16), ni en ratones BALB/c infectados. Lo que nos indica que el GSH ni el T(SH)₂ son fundamentales para la sobrevivencia del

parasito tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo* de la enfermedad de Chagas.

En la figura 22-A se observa el efecto de BSO sobre ratones infectados con *T. cruzi*, en ella podemos observar que BSO no tiene ningún efecto en la sobrevivencia de los ratones infectados a ninguna de las dosis estudiadas, lo que podría indicar que ni el GSH ni el T(SH)₂ son fundamentales para el desarrollo patológico de la enfermedad, no obstante a ello, en la figura 22-B que muestra el efecto de BSO sobre la parasitemia en ratones infectados, se observa una disminución significativa de este parámetro en ratones tratados con 1000 μ moles/Kg/día de BSO, dato interesante ya que a esta dosis no hay diferencia con la sobrevivencia, lo que indicaría que no existe correlación entre parasitemia y sobrevivencia del ratón infectado.

Las dosis de Nx 25 y 50 mg/kg/día que se asociaron a BSO son dosis subefectivas (figura 23) y que corresponden aproximadamente al 50% de la dosis efectiva (100 mg/Kg/día). Estas dosis fueron seleccionadas como aproximación de los datos obtenidos *in vitro* que ofrecían una potenciación cercana al 50%. En la figura 24 se observa el efecto sobre la sobrevivencia de ratones infectados con *t. cruzi* y tratados con Nx a las dosis indicadas y su asociación con BSO. Se observa que no hay diferencias significativas entre el control y el tratamiento con Nx ni con la asociación con BSO, pero si se observa un efecto en la parasitemia a la dosis de 25 mg/kg/día. Si comparamos este resultado con el de la figura 22-B, se deduce que la

disminución en la parasitemia está dada por la BSO y no existe un efecto ni sumatorio ni potenciador a ese nivel.

Al realizar el experimento con Bz se determina que la dosis de 10 mg/kg/día es subefectiva a diferencia de 25, 50 o 100 mg/kg/día. Al asociar esta dosis con BSO como se muestra en la figura 29 no se observan diferencias significativas en la sobrevivencia comparada con el control. Respecto de las parasitemias, igual que para el caso del Nx, se observa una disminución significativa de esta al asociar Bz 10 mg/Kg/día con BSO, no obstante esta diferencia estaría dado por el efecto de la BSO.

El *Trypanosoma cruzi*, una vez que ha ingresado al organismo infecta a todo tipo de células nucleadas, especialmente a macrófagos (Burleigh, 2002). Este parásito, al igual que otros agentes infecciosos, es capaz de evadir eficientemente la acción antiparasitaria del macrófago mediante algunos mecanismos adaptativos. Uno de estos mecanismos es evitar la activación de la iNOS con el consecuente aumento en la producción de NO y citocinas.

Estudios anteriores, han demostrado que macrófagos tratados con BSO, ven aumentados sus niveles intracelulares de NO, aumentando su acción antiparasitaria. Esto se debería a que el GSH es el encargado de controlar los niveles de NO, cuando estos aumentan en forma desmedida (Kapoor, 2002).

Por otra parte, el parásito sintetiza $T(SH)_2$ a partir de GSH y espermidina, el hecho de la disminución de los niveles de GSH y $T(SH)_2$ por efecto de la BSO, aumentaría los niveles disponibles de espermidina, lo que como consecuencia produciría una inhibición de su síntesis a partir de L-Arginina. (Freire de lima y cols. 2000). Esto produciría un aumento en la disponibilidad de la L-Arginina pudiendo aumentar la síntesis de NO por parte de la iNOS, potenciando de esta forma el efecto antiparasitario del macrófago.

En la figura 22, se observa una disminución de las parasitemias en ratones tratados con BSO; disminución que no se relaciona con la sobrevida de los animales. La observación anterior puede llevar a pensar en que el BSO produce un efecto directo sobre los tripomastigotes sanguíneos o bien, induce un aumento en la eficacia de la inmunidad innata. Evidentemente, esta situación es insuficiente para asegurar la supervivencia del hospedero.

En el mismo sentido, la BSO es una molécula de carácter hidrosoluble por lo que se distribuirá principalmente en el plasma (Griffith y Mulcahy 1999). Además, Según datos farmacocinéticos, BSO presenta un volumen de distribución de 20 Litros (O'Dwyer y cols., 1996; Gallo y cols., 1995). Este dato es importante, pensando que la fase aguda de la enfermedad, se caracteriza por una alta presencia de parásitos en el torrente sanguíneo los cuales al tener menor poder reductor dada la disminución en sus niveles de GSH y $T(SH)_2$, serían mas susceptibles al "Burst oxidativo" desencadenado

por células fagocíticas que a su vez podrían tener aumentados los niveles de NO.

Por otra parte, en los estudios histológicos no se aprecia una mejoría importante de la patología por efecto de la BSO ni por las drogas antichagásicas a dosis subefectivas, ni por la asociación de estas a BSO. Esto indica que el efecto observado de BSO es distinto en miocardio que en plasma situación que podría estar mediada por un bajo efecto en la inhibición de la GGCS en el miocardio. Al respecto existen estudios que han demostrado que luego de una administración intraperitoneal de BSO los niveles de GSH disminuyen en forma diferencial en los distintos órganos, siendo uno de los menos afectados el miocardio (Griffith, 1988).

Actualmente no se han desarrollado nuevas drogas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Aparentemente no se han desarrollado drogas más eficaces que Nx o Bz. Todos estos datos nos llevan a concluir que el efecto potenciador existe y es importante dados los resultados *in vitro*, sin embargo, *in vivo* BSO podría tener dificultades para poder actuar en los tejidos afectados por el parásito. Del mismo modo permite proyectar la importancia de desarrollar análogos de BSO con mayor liposolubilidad que puedan tener un efecto más importante *in vivo* y con una mayor selectividad para la enzima del parásito.

CONCLUSIONES

1. BSO a concentración de 500 μM disminuye significativamente los tioles en todas las formas del parásito.
2. BSO a concentraciones menores de 500 μM , no altera significativamente el crecimiento en epimastigotes de *T. cruzi*, cepas MF, LQ y Dm28c.
3. BSO 500 μM , potencia el efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*, cepas MF, LQ y Dm28c.
4. BSO 500 μM , potencia el efecto citotóxico de Nifurtimox y Benznidazol sobre la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi*, cepas MF, LQ y Dm28c.
5. BSO 25 μM potencia el efecto tripanocida de Nifurtimox y Benznidazol sobre la forma amastigota intracelular en células VERO infectadas.
6. BSO no tiene actividad tripanocida sobre cultivos de células VERO infectadas con *T. cruzi*.
7. BSO 500 μM potencia la acción tripanocida de Nifurtimox y Benznidazol sobre la forma tripomastigota de *T. cruzi*, cepa MF.
8. La forma infectiva tripomastigota y la multiplicativa intracelular amastigota fueron más sensibles a la potenciación comparada con la forma epimastigota.
9. Ni el GSH ni el T(SH)₂ son indispensables para la supervivencia del parásito ya sea en modelos *in vitro* o modelos *in vivo* de la enfermedad de Chagas.

10. BSO 1000 μ moles/Kg/día disminuye significativamente las parasitemias de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*. No obstante, esta situación no se correlaciona con las sobrevivencias.
11. El efecto potenciador de BSO sobre Nifurtimox y Benznidazol sólo se observó en modelos *in vitro*.

REFERENCIAS

Aldunate, J. and Morello, A. (1993) Free radicals in the mode of action of parasitic drugs. In: Free radicals in tropical diseases (Auroma, O.I Ed.) Harwood Academic Publishers. Pp:137-165.

Anderson CP, Tasi J, Chan W. (1997). Buthionine sulphoximine alone and in combination with melphalan (L-PAM) is highly cytotoxic for human neuroblastoma cell lines. Eur J Cancer; 33:2016-2019.

Anderson, M.E. (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. Chem Biol Interact. 24;111-112:1-14.

Apt, W. (1999) Tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Parasitología al Día. 23:100-112.

Arrick, B.A., Griffith, O.W. y Cerami, A. (1981). Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for trypanosomiasis. J. Exp. Med. 153:720-25.

Atías, A. (1998). Parasitología Médica. 1ª Ed. Santiago. Publicaciones Técnicas Mediterraneo Ltda. Pp. 251-264.

Aufderheide, A.C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., Arriaza, B., Renier, C., Wittmers, L.E. Jr, Fornaciari, G. y Allison M. (2004). A 9,000-year record of Chagas' disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(7):2034-9.

Awad, S., Henderson, G.B., Cerrami, A. and Held, K.D. (1992). Effects of trypanothione on the biological activity of irradiated transforming DNA. Int.

J. Radiat. Biol. 62:401-407.

Bacigalupo B A, Segura M JA, Garcia C A, Hidalgo C J, Galuppo G S, Cattan PE. (2006). First finding of Chagas disease vectors associated with wild bushes in the Metropolitan Region of Chile. Rev Med Chil. 134(10):1230-6.

Bailey, H.H., Mulcahy, R.T., Tutsch, K.D., Arzoomanian, R.Z., Alberti, D., Tor, M.B., Wilding, G., Pomplun, M., and Spriggs, D.R. (1994) Phase I clinical trial of intravenous L- buthionine sulfoximine and melphalan: an attempt at modulation of glutathione. J Clin Oncol. 12:194-205.

Bailey, H.H., Ripple, G., Tutsch, K.D., Arzoomanian, R.Z., Alberti, D., Feierabend, C., Mahvi, D., Schink, J., Pomplun, M., Mulcahy, R.T. and Wilding G. (1997) Phase I study of continuous-infusion L-S,R-buthionine sulfoximine with intravenous melphalan. J Natl Cancer Inst. 89(23):1789-96.

Bock M, Gonnert R & Haberkorn A (1969): Studies with Bay 2502 in animals. Bol Chile Parasit; 24:13-16

Burleigh BA, Woolsey AM. (2002). Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. Cell Microbiol. Nov;4(11):701-11.

Calvert P, Yao KS, Hamilton TC, O'Dwyer PJ. (1998). Clinical studies of reversal of drug resistance based on glutathione. Chem Biol Interact. 24;111-112:213-24.

Canals M, Bustamante RO, Ehrenfeld MH, Cattan PE. (1999). Assessing the impact of disease vectors on animal populations. Acta Biotheor. 46(4):337-45

Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol.* Aug;25(8):471-9.

Chagas, C. (1909). Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen, n.sp., agente etiológico do nova entidade mórbida do homen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1:159-218.

Clark, D., Albrecht, M., Arevalo, J. (1994) Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 66(1):143-5.

Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. (1985). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol.* 1985 Sep;16(3):315-27.

Cox F. E. G. (2002). History of Human Parasitology *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 595 - 612.

Diaz de Toranzo, E.G., Castro, J.A., Franke de Cazzulo, B.M. and Cazzulo, J.J. (1988) Interaction of Benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia.* 44(10):880-1.

Dickinson DA, Levonen AL, Moellering DR, Arnold EK, Zhang H, Darley-Usmar VM, Forman HJ. (2004). Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radic Biol Med.* 37(8):1152-9.

Dictar M, Sinagra A, Veron MT (1998). Recipients and donors of bone marrow transplants suffering from Chagas' disease: management and preemptive therapy of parasitemia. *Bone Marrow Transplant*; 21(4):391-393.

Docampo, R. and Moreno, S.N. (1984) Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *Rev Infect Dis*. 6(2):223-38.

Docampo, R. and Stoppani, A.O.M. (1979) Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by Nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys*. 191:317-321.

Docampo, R. y Stoppani, A.O. (1980) Sobre el mecanismo de acción tripanocida de nifurtimox y otros nitroderivados en *Trypanosoma cruzi*. *Medicina Buenos Aires* 40, Suppl. 1, 10–6.

Docampo, R., Moreno, S.N.J., Stoppani, A.O.M., Leon, W., Cruz, F.S., Villalta, F. And Muniz, R.F.A. (1981). Mechanism of Nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Pharmacol*. 30:1947-1951.

Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. Jan;82(1):47-95.

Dubin, M., Moreno, S.N.J., Martino, E.E., Docampo, R. And and Stoppani, A.O.M. (1983) Increased Biliary secretion and loss of hepatic glutathione in rat liver after Nifurtimox treatment. *Biochem. Pharmacol*. 32:483-487.

Eaton, D.L. (2000) Biotransformation enzyme polymorphism and pesticide susceptibility. *Neurotoxicology*. 21(1-2):101-11.

Estrela JM, Ortega A, Obrador E. (2006). Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci.*;43(2):143-81.

Fairlamb, A.H. and Cerami, A. (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida *Annu Rev Microbiol.* 46:695-729.

Fairlamb, A.H., Cerami, A. (1985) Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 14(2):187-98.

Fairlamb, A.H., Henderson, G.B., Bacchi, C.J. and Cerami, A. (1987) In vivo effects of difluoromethylornithine on trypanothione and polyamine levels in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 24:185-191.

Franke De Cazzulo, B.M., Bernacchi, A., Esteva, M.I., Ruiz, A.M., Castro, J.A. and Cazzulo, J.J. (1998) Trypanocidal effect of SKF525A, proadifen, on different developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. *Medicina-Buenos Aires.* 58(4):415-8.

Freire de Lima, Danielle O. Nascimento, Milena B. P. Soares, Patricia T. Bozza, Hugo C. Castro-Faria-Neto, Fernando G. de Mello, George A. DosReis, Marcela F. Lopes (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403, 199 – 203.

Frías D., Henry A. González CR. (1998). *Mepraia gajardoi*: a new species of Triatomidae (Hemiptera: Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia spinolai*. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 71: 177-188.

Gorla, N.B., Ledesma, O.S., Barbieri, G.P. and Larripa, I.B. (1989) Thirteen fold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutation Res.* 224:263-267.

Griffith OW, Meister A. (1979). Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem.* 254(16):7558-60.

Griffith, O.W. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis *Free Radic Biol Med.* 27(9-10):922-35.

Griffith, O.W. and Mulcahy, T. (1999) The enzymes of glutathione synthesis: gamma glutamylcysteine synthetase. *Adv. Enz. Relat. Areas Mol Biol.* 73:209-67.

Griffith, O.W. y Meister, A. (1985). Origin and Turnover of Mitochondrial Glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A ;*82;4668-4672

Gutteridge, J.M., Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann NY Acad Sci.* 899:136-47.

Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 31(4):261-72.

Hayes, J.D., McLellan, L.I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res;*31(4):273-300.

Ismail, S.O., Paramchuk, W., Skeiky, Y.A., Reed, S.G., Bhatia, A., Gedamu, L. (1997). Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 86(2):187-97.

Keppler, D. (1999). Export pumps for glutathione S-conjugates. Free Radic Biol Med. 27(9-10):985-91.

Kirchhoff Louis V (1993). American Trypanosomiasis (**Chagas' Disease**) A Tropical Disease Now in the United States. NEJM. 329, 639-644.

Krauth-Siegel, R.L., Coombs, G.H. (1999). Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets. Parasitol Today. 15(10):404-9.

Krauth-Siegel, R.L., Lüederman, H. (1996). Reduction of dehydroascorbate by trypanothione. Mol. Biochem. Parasitol. 80:203-208.

Letelier ME, Lepe AM, Faundez M, Salazar J, Marin R, Aracena P, Speisky H. (2005). Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. Chem Biol Interact. 151(2):71-82.

Letelier ME, Martinez M, Gonzalez-Lira V, Faundez M, Aracena-Parks P. (2006). Inhibition of cytosolic glutathione S-transferase activity from rat liver by copper. Chem Biol Interact. Dec 1;164(1-2):39-48.

Letelier, P. (2004) Estudio de crecimiento y contenido de tioles libres en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* tratados con butionina sulfoximia. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Lowry, O.H., Rosenbroug, N.J., Farr, A.L. y Randall, J.R. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

Luo J, Jankowski V, Henning L, Schluter H, Zidek W, Jankowski J. (2006). Endogenous coenzyme A glutathione disulfide in human myocardial tissue.

J Endocrinol Invest. 29(8):688-93.

Masana M, de Toranzo EG, Castro JA. (1984). Reductive metabolism and activation of Benznidazole. Biochem Pharmacol. Apr 1;33(7):1041-5.

Mason, R.P. and Holtzman, J.L. (1975). The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase Biochem Biophys Res Commun. 67(4):1267-74.

Maya J.D., Repetto Y., Agosin M., Ojeda J.M., Tellez R., Gaule C. and Morello A. (1997). Effects of Nifurtimox and Benznidazole upon glutathione and trypanothione in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 86, 101-106. 108.

Maya JD, Rodriguez A, Pino L, Pabon A, Ferreira J, Pavani M, Repetto Y, Morello A. (2004). Effects of buthionine sulfoximine nifurtimox and benznidazole upon trypanothione and metallothionein proteins in *Trypanosoma cruzi*. Biol Res. 37(1):61-9.

Mazur, L. (2000). Radioprotective effects of the thiols GSH and WR-2721 against X-ray-induction of micronuclei in erythroblasts. Mutat Res. 468(1):27-33.

Mehlotra RK. (1996). Antioxidant defense mechanisms in parasitic protozoa. *Crit Rev Microbiol.*;22(4):295-314.

Miles M. (2003). American tripanosomiasis and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ.* 326: 1444-1448.

Molyneux, D.H. and Ashford, R.W. (1983). *The Biology of Trypanosoma and Leishmania, Parasites of Man and Domestic Animals.* London, England, Taylor and Francis, Eds. 294 p

Morello A, Lipchenca I, Cassels BK, Speisky H, Aldunate J, Repetto Y. (1994). Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol.*107(3):367-71.

Morello, A.; Letelier, M.E.; Aldunate, J.; Repetto, Y. (1987). Enfermedad de Chagas, biotransformación de xenobióticos por el *Trypanosoma cruzi*. In *Estudios en honor de Gustavo Hoecker.* Auch 14: 33-48.

Moreno, S.N., Docampo, R., Mason, R.P., Leon, W. And Stoppani, A.O. (1982). Different behaviors of Benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch Biochem Biophys.* 218(2):585-91.

Muelas S, Suarez M, Perez R, Rodriguez H, Ochoa C, Escario JA, Gomez-Barrio A. (2002). In vitro and in vivo assays of 3,5-disubstituted-tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazin-2-thione derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97(2):269-72.

Murta, S.M., Ropert, C., Alves, R.O., Gazzinelli, R.T. y Romanha, A.J. (1999). In-vivo treatment with Benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Parasite Immunol.* 21(10):535-44.

Nogueira FB, Krieger MA, Nirde P, Goldenberg S, Romanha AJ, Murta SM. (2006). Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. *Acta Trop.* 100(1-2):119-32.

O'Dwyer, P.J., Hamilton, T.C., LaCreta, F.P., Gallo, J.M., Kilpatrick, D., Halbherr, T., Brennan, J., Bookman, M.A., Hoffman, J., Young, R.C., Comis, R.L. and Ozols, R.F. (1996) Phase I trial of buthionine sulfoximine in combination with melphalan in patients with cancer. *J Clin Oncol.* 14:249-56.

Olivieri BP, Cotta-De-Almeida V, Araujo-Jorge T. (2002). Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8+ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. *Antimicrob Agents Chemother.* Dec;46(12):3790-6.

Oza SL, Tetaud E, Ariyanayagam MR, Warnon SS, Fairlamb AH. (2002). A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 2002 Sep 27;277(39):35853-61.

Piacenza L, Irigoien F, Alvarez MN, Peluffo G, Taylor MC, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R. (2007). Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochem J.* 403(2):323-34.

Piaggio E, Sanceau J, Revelli S, Bottasso O, Wietzerbin J, Serra E. (2001). Trypanocidal drug Benznidazole impairs lipopolysaccharide induction of macrophage nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF-kappaB activation. *J Immunol.* Sep 15;167(6):3422-6.

Polak A & Richle R: (1978). Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative Benznidazole. *Ann Trop Med Parasitol*; 72(1):45-54.

Pourahmad, J., O'Brien, P.J. (2000). A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. *Toxicology.* 143(3):263-73.

Reliene R, Schiestl RH. (2006). Glutathione depletion by buthionine sulfoximine induces DNA deletions in mice. *Carcinogenesis.* 27(2):240-4.

Repetto, Y., Opazo, E., Maya, J.D., Agosín, M. And Morello, A. (1996). Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*. Effects of drugs. *Comp. Biochem., Physiol.* 115B(2):281-285.

Rodrigues-Coura, J.; L. De Castro, S. (2002). A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 97(1): 3-24.

Sies, H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 27(9-10):916-21.

Stoppani, A.O. (1999). Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. Medicina (B Aires). 59 Suppl 2:147-65; 94.

Tate SS, Meister A. (1974). Stimulation of the hydrolytic activity and decrease of the transpeptidase activity of gamma-glutamyl transpeptidase by maleate; identity of a rat kidney maleate-stimulated glutaminase and gamma-glutamyl transpeptidase. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep;71(9):3329-33.

Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. (2006). Chagas disease. Postgrad Med J.82(974):788-98.

Temperton, N.J., Wilkinson, S.R., Meyer, D.J. and Kelly, J.M. (1998) Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and Benznidazole. Mol Biochem Parasitol. 96(1-2):167-76.

Turrens, J.F., Watts, B.P., Zhong, L. And Docampo, R. (1996) Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* NADH-fumarate reductase by Benznidazole and antihelminthic imidazole derivatives. Mol. Biochem. Parasitol. 82:125-129.

Urbina J. A., Renee Lira, G. y Bartrolí J. (2000). In Vitro Antiproliferative Effects and Mechanism of Action of the New Triazole Derivative UR-9825 against the Protozoan Parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Antimicrob. Agents Chemother., 44: 2498 - 2502.

Urbina JA, Concepcion JL, Caldera A, Payares G, Sanoja C, Otomo T, Hiyoshi H. (2004). In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(7):2379-87.

Urbina JA, Docampo R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 2003 Nov;19(11):495-501.

Urbina, J.A., Payares, G., Sanoja, C., Lira, R. y Romanha, A.J. (2003) In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents*21(1):27-38.

Van Voorhis WC: (1990). Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. *Drugs*; 40:176-202.

Vanhoefer U, Cao S, Minderman H, Toth K, Skenderis BS 2nd, Slovak ML, Rustum YM. (1996). d,l-buthionine-(S,R)-sulfoximine potentiates in vivo the therapeutic efficacy of doxorubicin against multidrug resistance protein-expressing tumors. *Clin Cancer Res.*;2(12):1961-8.

Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E. (1994). Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J.* 127(1):151-62.

WHO Expert Committee. (2002) Second Report. Control of Chagas Disease. Technical Report Series, No. 905.

Wilkinson SR, Prathalingam SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM. (2005). Vitamin C biosynthesis in trypanosomes: a role for the glycosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(33):11645-50.

- Wilkinson**, S.R., Temperton, N.J., Mondragon, A., Kelly, J.M. (2000)
Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-
dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* J Biol Chem.
275(11):8220-5.
- Yang** Heping, Magilnick Nathaniel, Ou Xiaopeng And Shelly C. LU. (2005)
Tumour necrosis factor α induces co-ordinated activation of rat GSH
synthetic enzymes via nuclear factor κ B and activator protein-1. Biochem.
J. 391, 399–408.
- Zahoor**, A., Lafleur, M.V., Knight, R., Loman, H., Edwards, D.I. (1987)
DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. Biochem
Pharmacol. 36(19):3299-304.