



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

**EFFECTO COMPARATIVO DE LOS ÉSTERES
ETÍLICO Y BENCÍLICO DEL ÁCIDO N-PROPILO
OXÁMICO SOBRE FASES INTRACELULARES DE
Trypanosoma cruzi Y LA PARASITEMIA EN
RATÓN**

T E S I S
QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA
Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR
P R E S E N T A
M. en C. CHARMINA AGUIRRE ALVARADO



**DIRECTORES DE TESIS:
DR. CARLOS WONG RAMÍREZ
DR. BENJAMÍN NOGUEDA TORRES**

MÉXICO, D. F. 2010

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

“EFECTO COMPARATIVO DE LOS ÉSTERES ETÍLICO Y BENCÍLICO DEL ÁCIDO N-PROPIL OXÁMICO SOBRE FASES INTRACELULARES DE *Trypanosoma cruzi* Y LA PARASITEMIA EN RATÓN”

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y EN EL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA, DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. CARLOS WONG RAMÍREZ Y EL DR. BENJAMÍN NOGUEDA TORRES.

CON EL APOYO DE LAS BECAS OTORGADAS POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) Y EL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE FORMACIÓN DE INVESTIGADORES DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (PIFI-IPN).

RESEARCH ARTICLE

Trypanocidal activity of the ethyl esters of *N*-propyl and *N*-isopropyl oxamates on intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* acute infected mice

Charmina Aguirre-Alvarado¹, Fabiola Zaragoza-Martínez², Lorena Rodríguez-Páez¹, Juan Luis Téllez-Rendón², Benjamín Noguera², Isabel Baeza¹, and Carlos Wong¹

¹Departamento de Bioquímica, and ²Departamento de Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas–Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

Abstract

In this investigation we studied the trypanocidal activity of the ethyl esters of *N*-propyl (Et-NPOX) and *N*-isopropyl (Et-NIPOX) oxamates on bloodstream trypomastigotes and on the clinically relevant intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* acute infected mice. In the infected and treated mice, the levels of parasitemia were drastically reduced between days 15 and 20 of treatment and almost to zero between days 35 and 40. We also found that Et-NPOX completely eliminated amastigote nests in the myocardium of mice infected with INC-5 or NINOA *T. cruzi* strain, and in skeletal muscle the reduction in the number of amastigote nests was between 60 and 80% in both strains. Also, Et-NIPOX reduced by 60–80% the number of amastigote nests in the myocardium and skeletal muscle of mice infected with these *T. cruzi* strains. In contrast, nifurtimox, used for comparison, produced a reduction of amastigote nests of only 20–40% in the studied tissues in both strains.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; prodrugs; ethyl *N*-isopropyl oxamate; ethyl *N*-propyl oxamate; amastigotes

Introduction

Chagas' disease is an endemic parasitic disease in Latin America, and it is caused by *Trypanosoma cruzi*¹. The vectorial transmission is effected by triatomine insects²; humans and wild and domestic animals are the natural reservoirs of *T. cruzi*. It is estimated that 16–18 million people are infected by *T. cruzi* and that some 100 million are at risk of acquiring Chagas' disease^{2,3}. There are three stages of the human disease: the acute stage which appears shortly after infection, characterized by a large increase of bloodstream trypomastigotes, followed by a silent or asymptomatic stage, and the chronic stage, characterized by a large increase of intracellular amastigotes, which may last several years and irreversibly affects internal organs such as the heart, esophagus, colon, and peripheral nervous system⁴.

Chagas' disease remains practically incurable due to the limited interest in developing new antichagasic drugs and the fact that the clinically available drugs for the treatment of

Chagas' disease, benznidazole and nifurtimox (Nx), markedly reduce the parasitemia in the acute stage but they are ineffective in the chronic stage⁵. Natural resistance to these drugs has been suggested as an important factor to explain the low rate of cure detected in chagasic patients⁶. Thus, a search for new agents that exhibit trypanocidal activity against intracellular *T. cruzi* amastigotes seems justifiable.

In previous investigations we designed and synthesized *N*-propyl oxamate (NPOX) and *N*-isopropyl oxamate (NIPOX) as possible inhibitors of *T. cruzi* α -hydroxyacid dehydrogenase (HADH)-isozyme II, and we found that these oxamates were indeed competitive and selective inhibitors of this isozyme (Figure 1)^{7,8}. Since HADH-isozyme II participates in the energetic metabolism of *T. cruzi*^{9–11}, a trypanocidal effect can be expected with these inhibitors^{12,13}. However, when we tested the trypanocidal activity of NPOX and NIPOX, we were not able to detect any trypanocidal effect with these oxamates. In contrast, the corresponding

Address for Correspondence: C. Wong, Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas–Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 4-129, Admon. 4, Mexico City, 06401, Mexico. Tel/fax: 52 55 57296000, ext 62321. E-mail: cwong@encb.ipn.mx

(Received 05 September 2008; revised 13 March 2009; accepted 04 May 2009)

ethyl esters (Et-NPOX and Et-NIPOX), acting as prodrugs, exhibited trypanocidal activity on cultured epimastigotes (*in vitro*) and murine trypanosomiasis (*in vivo*) in all the tested *T. cruzi* strains^{8,14,15}. The increased effectiveness of Et-NPOX and Et-NIPOX resulted from their better absorption by this parasite and their efficient hydrolysis inside *T. cruzi* by its carboxylesterases^{16,17}, generating the active HADH-isozyme II inhibitors and NIPOX *in situ*^{14,15}.

Accordingly, in the present investigation we studied the possible trypanocidal activity of the ethyl esters of *N*-propyl and *N*-isopropyl oxamates on bloodstream trypomastigotes and intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* acute infected mice.

Materials and methods

Chemicals

Trypan blue (tetrasodium salt), hematoxylin, eosin, and crystal violet were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Other chemicals used were of the highest purity available. Nifurtimox (tetrahydro-3-methyl-4-[5-nitro-furfurilidene)amine]-2-methyl-tetrahydro-1,4-thiazine-4,4-dioxide was from Bayer, Mexico. NPOX, NIPOX, and the corresponding esters, Et-NPOX and Et-NIPOX, were synthesized according to methods reported elsewhere^{7,14}.

T. cruzi strains

Two *T. cruzi* strains, NINOA and INC-5, isolated from chronic chagasic patients of two different endemic areas of Mexico, were used in this investigation. The *T. cruzi* stock strains were isolated by xenoculture according to Bronfen *et al.*¹⁸. Following the method described by Chiari *et al.*¹⁹, feces of infected triatomine insects were inoculated intraperitoneally into laboratory mice and cardiac blood was cultured subsequently at 28°C on either enriched biphasic blood agar medium or the monophasic liquid medium, liver infusion tryptone broth (LIT), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum.

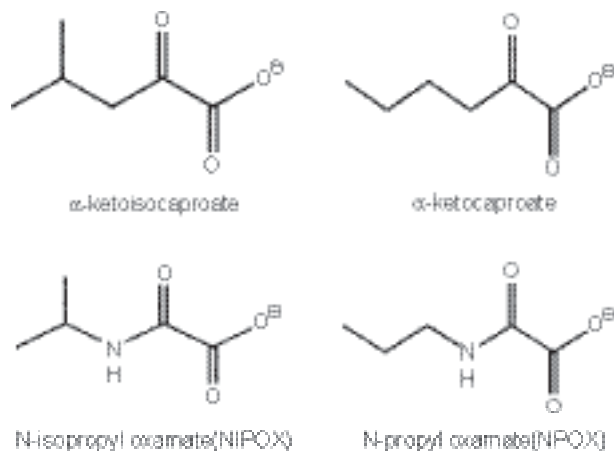


Figure 1. Structures of α -ketocaproate and α -ketoisocaproate, the best substrates of *T. cruzi* α -HADH-isozyme II, and the inhibitors *N*-propyl oxamate and *N*-isopropyl oxamate.

Trypanocidal assay

The level of parasitemia was determined by counting in a Neubauer chamber the number of parasites in 5 μ L of blood collected from the mouse tail and diluted 1:10 in ammonium chloride, according to Filardi and Brener²⁰ and Barr *et al.*²¹. The reduction in parasitemia was evaluated by comparing the number of parasites obtained at each time point after drug administration with the number of parasites obtained at the same time points in infected, non-treated mice.

Evaluation of drug activity on intracellular amastigotes of *T. cruzi* acute infected mice

Eighty male National Institutes of Health (NIH) albino mice (18–20 g per mouse, 10 mice per group) were inoculated intraperitoneally with 1×10^3 bloodstream trypomastigotes. Four groups were infected with *T. cruzi* NINOA strain and the other four groups were infected with *T. cruzi* INC-5 strain. The trypanocidal prodrugs Et-NIPOX and Et-NPOX, and the drug Nx, were administered orally, dissolved in a 5% gum Arabic solution, at a dose of 10 mg/kg per day during 60 days. The first dose was given 24 h after the infection.

Mice were divided into the following groups: (1) infected with *T. cruzi* (NINOA) as a control; (2) infected with *T. cruzi* (NINOA) and treated with Et-NPOX; (3) infected with *T. cruzi* (NINOA) and treated with Et-NIPOX; (4) infected with *T. cruzi* (NINOA) and treated with Nx; (5) infected with *T. cruzi* (INC-5) as a control; (6) infected with *T. cruzi* (INC-5) and treated with Et-NPOX; (7) infected with *T. cruzi* (INC-5) and treated with Et-NIPOX; (8) infected with *T. cruzi* (INC-5) and treated with Nx. The experimental procedure was carried out in accordance with the “Guide for the care and use of laboratory animals” published by the US NIH, publication number²². Levels of parasitemia were determined in a Neubauer hemocytometer beginning 24 h after infection.

Histopathological studies of mouse hearts and left legs were done 60 days post-infection. Thin (3 μ m) sections of heart tissue from *T. cruzi* infected mice, treated or not treated with NPOX, NIPOX, or Nx (10 mg/kg per day), were formaldehyde-fixed, dehydrated, and embedded in paraffin. Sections were stained by hematoxylin–eosin (H&E) and analyzed by light microscopy ($\times 40$). Fifty randomly selected microscopic fields were examined to quantify the number of amastigote nests. Histopathological studies of the hearts and legs of each group were done in triplicate. The mean number of amastigote nests in the tissue slices of the infected group not submitted to drug treatment was taken as 100%. The results were evaluated statistically, using Student’s *t* test for parasitemia and the χ^2 test for histopathology; the significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Effect of Et-NIPOX, Et-NPOX, and Nx on acute parasitemia of mice infected with INC-5 *T. cruzi* strain

Figure 2 shows that treatment of the infected mice with Et-NIPOX, Et-NPOX, and Nx, at a dose of 10 mg/kg during 60

days, markedly decreased the parasitemia induced by INC-5 *T. cruzi* strain. This figure also shows that after 20 days of treatment, parasitemia sharply decreased, and after 40 days of treatment the parasitemia was reduced to zero in the groups treated with Et-NPOX and Nx. In the group treated with Et-NIPOX, the parasitemia was no longer evident after 55 days of treatment. In contrast, in the infected and non-treated group the parasitemia remained very high between days 20 and 40 after infection.

Effect of Et-NIPOX, Et-NPOX, and Nx on acute parasitemia of mice infected with NINOA *T. cruzi* strain

Figure 3 shows that treatment of the infected mice with Et-NIPOX, Et-NPOX, and Nx, at a dose of 10 mg/kg during 60 days, markedly decreased the parasitemia induced by NINOA *T. cruzi* strain. This figure also shows that after 15 days of treatment, the parasitemia sharply decreased, and after 35 days of treatment the parasitemia was reduced almost to zero in all the treated groups. In contrast, in the infected and non-treated group the parasitemia remained very high between days 15 and 40 after infection.

Effect of Et-NIPOX, Et-NOPX, and Nx on amastigote nests in myocardium of mice infected with INC-5 or NINOA *T. cruzi* strain

Figure 4 shows that Et-NIPOX, administered at a dose of 10 mg/kg during 60 days, reduced by 60–80% the number of amastigote nests in cardiac muscle of mice infected with INC-5 or NINOA *T. cruzi* strain. Also, Et-NPOX completely eliminated amastigote nests in cardiac muscle of mice infected with INC-5 or NINOA *T. cruzi* strain. In contrast, nifurtimox, the drug used for comparison, produced a reduction of amastigote nests of only 20–40%. These experiments are in agreement with previous reports describing the low trypanocidal effect of nifurtimox in the chronic stage of Chagas' disease⁷.

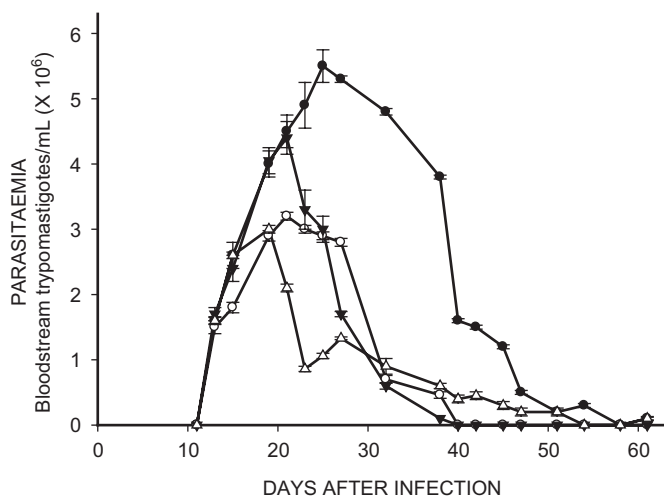


Figure 2. Effect of ethyl ester of *N*-propyl oxamate (Et-NPOX) (Δ), ethyl ester of *N*-isopropyl oxamate (Et-NIPOX) (\blacktriangledown), and nifurtimox (\circ) on acute parasitemia of mice infected with INC-5 *T. cruzi* strain, using as a control (\bullet) infected and non-treated mice. The drugs were administered orally 10 mg/kg per day during 60 days.

Effect of Et-NPOX, Et-NIPOX, and Nx on amastigote nests in skeletal muscle of mice infected with INC-5 or NINOA *T. cruzi* strain

Figure 5 shows that Et-NPOX and Et-NIPOX, administered at a dose of 10 mg/kg during 60 days, produced in skeletal muscle a reduction in the number of amastigote nests of 60–80%. In contrast, nifurtimox, the drug used for comparison, produced a reduction of amastigote nests of only 20–40% in skeletal muscle of mice infected with INC-5 or NINOA *T. cruzi* strain. These experiments are in agreement with previous reports describing the low trypanocidal effect of this compound in the chronic stage of Chagas' disease⁷.

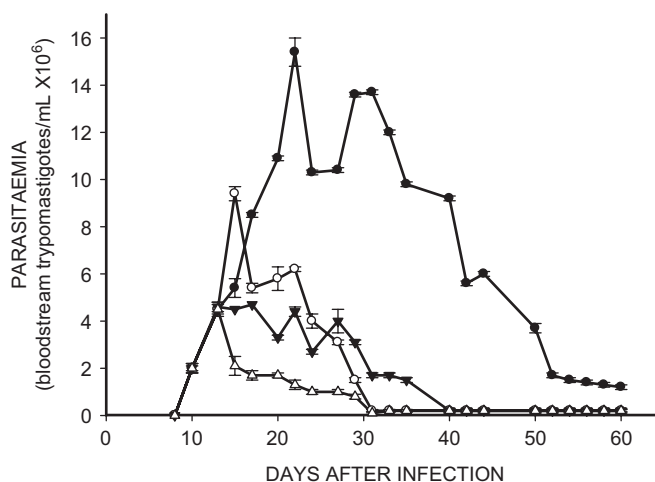


Figure 3. Effect of ethyl ester of *N*-propyl oxamate (Et-NPOX) (Δ), ethyl ester of *N*-isopropyl oxamate (Et-NIPOX) (\blacktriangledown), and nifurtimox (\circ) on acute parasitemia of mice infected with NINOA *T. cruzi* strain, using as a control (\bullet) infected and non-treated mice. The drugs were administered orally 10 mg/kg per day during 60 days.

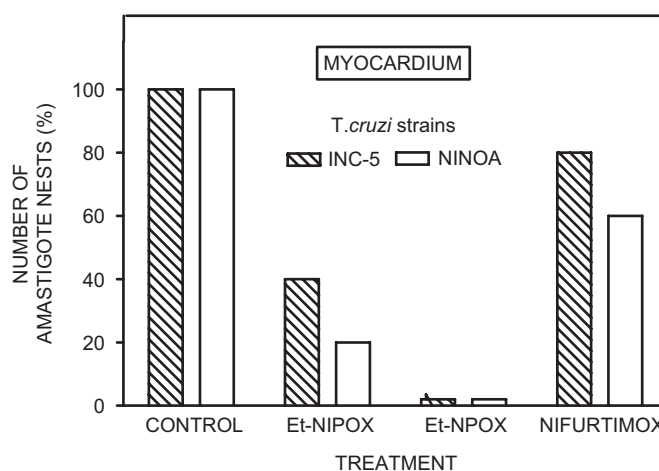


Figure 4. Effect of ethyl ester of *N*-isopropyl oxamate (Et-NIPOX), ethyl ester of *N*-propyl oxamate (Et-NPOX), and nifurtimox on *T. cruzi* amastigote nests in myocardium of mice infected with INC-5 (hatched columns) or NINOA (open columns) *T. cruzi* strain. The drugs were administered orally 10 mg/kg per day during 60 days.

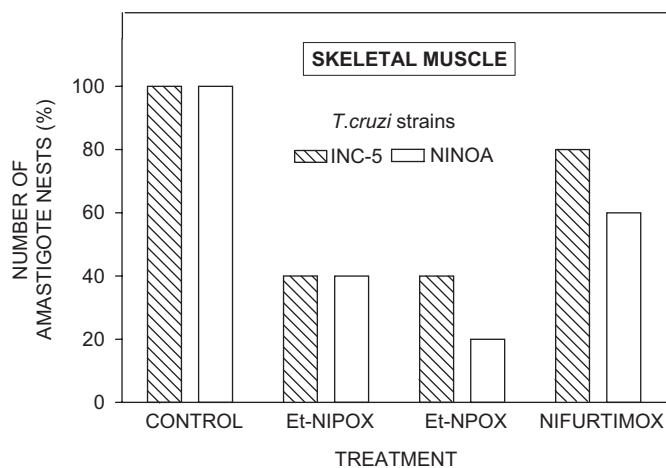


Figure 5. Effect of ethyl ester of *N*-isopropyl oxamate (Et-NIPOX), ethyl ester of *N*-propyl oxamate (Et-NPOX), and nifurtimox on *T. cruzi* amastigote nests in skeletal muscle of mice infected with INC-5 (hatched columns) or NINOA (open columns) *T. cruzi* strain. The drugs were administered orally 10 mg/kg per day during 60 days.

Histopathological studies of myocardium and skeletal muscle of mice infected with NINOA or INC-5 *T. cruzi* strain and treated with Et-NPOX

Figure 6 shows some of the histopathological studies of myocardium and skeletal muscle of mice infected with NINOA or INC-5 *T. cruzi* strain and treated with Et-NPOX, 10 mg/kg per day during 60 days. This figure also shows that Et-NPOX completely eliminated amastigote nests in the myocardium of mice infected with NINOA or INC-5 *T. cruzi* strain, whereas in skeletal muscle the reduction of amastigote nests by Et-NPOX was around 60–80%.

Discussion

Since the clinically available drugs for the treatment of Chagas' disease reduce only the severity of the acute disease, but they are ineffective in chronic stages of the infection⁵, in this investigation we studied the possible trypanocidal activity of the ethyl esters of *N*-propyl and *N*-isopropyl oxamates on bloodstream trypomastigotes and on the intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* acute infected mice.

T. cruzi presents a complex life cycle involving several morphological and functionally different stages that adapt to a variety of conditions imposed by the insect vector and mammalian host environments. The trypomastigotes, the infective form of *T. cruzi*, live in the blood, and they are dependent upon their own vigorous cell motility for extravasation and dissemination within the host²³. It is evident that cell motility plays an important role in the pathogenesis of Chagas' disease. Taking advantage of this cell motility, the bloodstream trypomastigotes invade mammalian cells where they undergo differentiation into amastigotes, the replicative form of *T. cruzi*. The amastigotes then undergo many cycles of multiplication by binary fission, and transform again into mobile bloodstream trypomastigotes, leading to the rupture of colonized cells during the chronic stage of the infection. These tissue lesions can be detected as

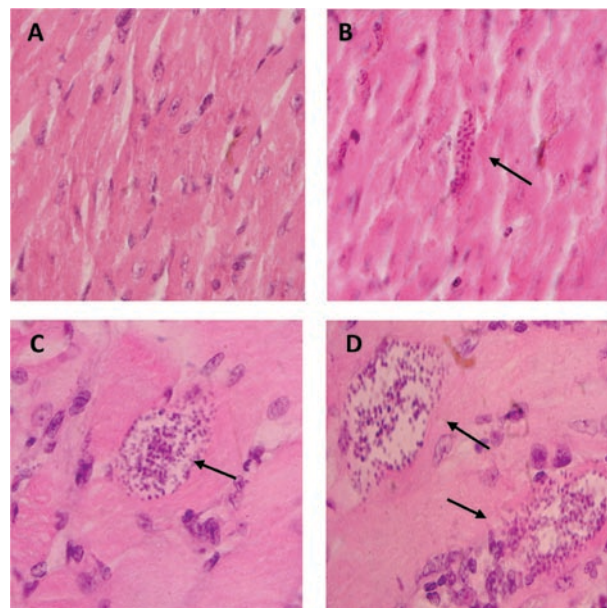


Figure 6. Histopathological studies of myocardium and skeletal muscle of mice infected with NINOA or INC-5 *T. cruzi* strain. (A) Myocardium from (NINOA) *T. cruzi* infected mice treated with the ethyl ester of *N*-propyl oxamate (Et-NPOX). (B) Myocardium from (NINOA) *T. cruzi* infected, non-treated mice. (C) Skeletal muscle from (NINOA) *T. cruzi* infected mice treated with Et-NPOX. (D) Skeletal muscle from (NINOA) *T. cruzi* infected, non-treated mice. Similar results were obtained in myocardium and skeletal muscle from (INC-5) *T. cruzi* infected mice, non-treated and treated with the ethyl ester of *N*-isopropyl oxamate (Et-NIPOX). The drugs were administered orally 10 mg/kg per day during 60 days. Tissue slices were stained with hematoxylin-eosin and were analyzed with a $\times 40$ objective. The arrows indicate the location of amastigote nests.

amastigote nests in histopathological studies. So, to evaluate the possible trypanocidal effect of Et-NPOX and Et-NIPOX on intracellular amastigotes, we used a murine model of acute Chagas' disease. Male NIH albino mice were inoculated with bloodstream trypomastigotes of INC-5 or NINOA *T. cruzi* strain. The prodrugs Et-NPOX and Et-NIPOX and the drug Nx used for comparison were administered at a dose of 10 mg/kg per day during 60 days, and at the end of the treatment, the trypanocidal effect of these drugs on intracellular amastigotes was evaluated by detecting and counting the amastigote nests in myocardium and skeletal muscle of infected, treated and non-treated mice. Additionally, the level of parasitemia was followed over time in the treated and non-treated mice.

In the infected and non-treated mice we obtained classic bell shaped curves of parasitemia, with a maximum peak of 5.5×10^6 bloodstream trypomastigotes/mL with the INC-5 *T. cruzi* strain and of 15×10^6 trypomastigotes/mL with the NINOA *T. cruzi* strain. In the infected and treated mice the parasitemia was drastically reduced between days 15 and 20, and was reduced almost to zero between days 35 and 40. In contrast, in the infected and non-treated group the parasitemia remained very high between days 15 and 40 after infection.

The trypanocidal experiments on intracellular *T. cruzi* amastigotes showed that Et-NPOX completely eliminated

amastigote nests in the cardiac muscle of mice infected with INC-5 or NINOA *T. cruzi* strain, and in skeletal muscle the reduction in the number of amastigote nests was between 60 and 80% in both strains. Also, Et-NIPOX reduced by 60–80% the number of amastigote nests in both cardiac and skeletal muscles of mice infected with these *T. cruzi* strains. In contrast, Nx, the drug used for comparison, produced a reduction of amastigote nests of only 20–40% in cardiac and skeletal muscles of mice infected with these *T. cruzi* strains. These findings are in agreement with previous reports describing the low trypanocidal effect of this drug in the chronic stage of Chagas' disease⁷.

These pharmacological studies show that the prodrugs Et-NPOX and Et-NIPOX have an *in vivo* trypanocidal effect not only on bloodstream trypomastigotes, but also on the clinically relevant intracellular proliferative form of the parasite. The reduction in the number of both circulating and intracellular parasites produced by Et-NPOX and Et-NIPOX was clearly demonstrated. In contrast, Nx showed a poor trypanocidal effect on intracellular amastigotes in this experimental model of the acute stage of Chagas' disease.

In conclusion, the results we have presented above show that Et-NPOX and Et-NIPOX have trypanocidal activity against bloodstream trypomastigotes and intracellular amastigotes of INC-5 and NINOA *T. cruzi* strains in a murine model of acute Chagas' disease.

At the dose and the treatment duration used in this work, Et-NPOX and Et-NIPOX given by the oral route were very well tolerated by mice. No deleterious effects on weight gain and general physical condition of the treated animals, or in the histopathological studies of tissues such as the myocardium and the skeletal muscle, were observed.

Acknowledgements

This work was partially supported by research grants from the Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional (SIP-IPN), México. Four of the authors (C.W., L.R.-P., B.N., I.B.) are fellows of SNI-CONACYT and COFAA-IPN, and three of the authors (C.A.-A., F.Z.-M., J.L.T.-R.) are fellows of CONACYT and PIFI-IPN.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest.

References

- Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas' disease. *Postgrad Med J* 2006;82:788–98.
- World Health Organization. Chagas' disease special program for research and training in tropical diseases. Geneva: WHO, 1993:67–75.

- World Health Organization. Control of Chagas' disease. *Tech Rep Ser* 2002;905:1–109.
- Moncayo A. Progress towards interruption of transmission of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:401–4.
- Urbina JA. Parasitological cure of Chagas' disease: is it possible? Is it relevant? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:349–55.
- Rodrigues-Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas' disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:3–24.
- Chena MA, Elizondo-Jimenez S, Rodríguez-Páez L, Nogueira-Torres B, Baeza-Ramírez I, Wong-Ramírez C. *Trypanosoma cruzi*: inhibition of α -hydroxyacid dehydrogenase isozyme II by N-allyl and N-propyl oxamates and their effects on intact epimastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99:831–7.
- Elizondo S, Chena MA, Rodríguez-Páez L, Nogueira B, Baeza I, Wong C. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* alpha-hydroxyacid dehydrogenase-isozyme II by N-isopropyl oxamate and its effect on intact epimastigotes. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2003;18:265–71.
- Opperdoes FR. Biochemical peculiarities of trypanosomes African and South American. *Br Med Bull* 1985;41:130–6.
- Coronel CE, Rovai LE, Gerez de Burgos NM, Burgos C, Blanco A. Properties of α -hydroxyacid dehydrogenase isozymes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1981;4:29–38.
- Coronel CE, Gerez de Burgos NM, Burgos C, Blanco A. Separación y propiedades catalíticas de la isoenzima de la α -hidroxiaácido deshidrogenasa de *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)* 1980;40:159–64.
- Bakker BM, Westerhoff HV, Opperdoes FR, Michels PA. Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Mol Biochem Parasitol* 2000;106:1–10.
- Verlinde CL, Hannaert V, Blonski C, Willson M, Périé JJ, Fothergill-Gilmore LA, et al. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Updat* 2001;4:50–65.
- Chena MA, Elizondo S, Rodríguez-Páez L, Nogueira B, Baeza I, Wong C. Trypanocidal activity of N-isopropyl oxamate on cultured epimastigotes and murine trypanosomiasis using different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2005;20:189–97.
- Aguirre-Alvarado C, Zaragoza-Martínez F, Rodríguez-Páez L, Nogueira B, Baeza I, Wong C. In vitro and in vivo trypanocidal activity of the ethyl esters of N-allyl and N-propyl oxamates using different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2007;22:227–33.
- Aldunate J, Repetto Y, Letelier ME, Morello A. The carboxyl esterases of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol* 1987;86:67–71.
- Repetto Y, Aldunate J, Morello A. *Trypanosoma cruzi*: carboxylesterase activity in intact epimastigotes. *Comp Biochem Physiol B* 1983;76:61–4.
- Bronfen E, Rocha FSA, Machado GBN. Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por genodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989;84:234–40.
- Chiari E, Diaz JCP, Lana M, Chiari CA. Haemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 1989;22:19–23.
- Filardi LS, Brenner Z. A rapid method for testing in vivo the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984;79:221–5.
- Barr JC, Rose D, Jaines JM. Activity of lytic peptides against intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes *in vitro* and parasitaemia in mice. *J Parasitol* 1995;81:974–8.
- National Institutes of Health. Guide for the care and use of laboratory animals. DHEW Publication 85–123. Bethesda, MD: Office of Science and Health Reports, DRR/NIH, 1985.
- Hill KL. Biology and mechanism of trypanosome cell motility. *Eukaryotic Cell* 2003;2:200–8.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
SUMMARY	II
ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE GRÁFICAS	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aspectos generales de la enfermedad de Chagas	1
1.1.1 Transmisión	6
1.1.2 Manifestaciones clínicas	8
1.2 Mecanismos de evasión del sistema inmunológico empleados por <i>Trypanosoma cruzi</i> .	10
1.3 Diagnóstico	12
1.4 Quimioterapia	13
1.4.1 Nifurtimox y Benznidazol	14
1.4.2 Otros fármacos sin utilidad clínica reconocida	16
1.4.3 Blancos bioquímicos prometedores para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas	16
1.5 <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
1.5.1 Ciclo de vida	17

1.5.2 Metabolismo energético de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.5.3 α -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II (α -HADH)	23
1.6 Antecedentes	25
1.7. JUSTIFICACIÓN	28
1.8 HIPÓTESIS	29
1.9 OBJETIVOS	29
1.9.1 Objetivo General	29
1.9.2 Objetivos Particulares	29
2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1 Compuestos químicos a evaluar	30
2.2 Material biológico	31
2.3 Determinación de la permeabilidad del NPOx-B a la membrana de los epimasgotes de <i>T. cruzi</i> .	32
2.4 Estudio <i>in vitro</i> del alcohol bencílico sobre la viabilidad de epimastigotes en cultivo.	32
2.5 Efecto del NPOx-Et y NPOx-B sobre el metabolismo energético de <i>T. cruzi</i>	33
2.5.1 Medición de los cantidad intracelular de ATP total en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	34
2.5.2 Determinación de la concentración intracelular de NAD ⁺ en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	36

2.6 Determinación de la toxicidad del NPOx-Et y NPOx-B <i>in vitro</i> sobre la viabilidad de cultivos celulares.	37
2.7 Determinación de la toxicidad oral aguda del NPOx-Et y NPOx-B.	37
2.8 Efecto tripanomicida de los esteres etílico y bencílico del ácido N-propil oxámico <i>in vivo</i> .	38
2.8.1 Efecto tripanomicida del NPOx-Et y NPOx-B administrados a corto plazo.	38
2.8.2 Efecto tripanomicida del NPOx-Et y NPOx-B administrados a largo plazo.	39
3. RESULTADOS.	41
3.1 Determinación de la permeabilidad del NPOx-B a la membrana de los epimasgotes de <i>T. cruzi</i> .	41
3.2 Estudio <i>in vitro</i> del alcohol bencílico sobre la viabilidad de epimastigotes en cultivo.	43
3.2.1. Comparación del efecto tripanomicida del alcohol bencílico con el alcohol etílico y NPOx-B.	44
3.3 Efecto del NPOx-Et y NPOx-B sobre el metabolismo energético de <i>T. cruzi</i>	46
3.3.1 Medición de los niveles intracelulares de ATP total en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .	46
3.3.2. Efecto comparativo de la cantidad de ATP con la viabilidad de cultivos epimastigotes	48
3.3.3 Determinación de la concentración intracelular de NAD ⁺ en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	49

3.3.4. Efecto comparativo de los niveles intracelulares de NAD ⁺ con la viabilidad de cultivos epimastigotes.	51
3.4 Determinación de la toxicidad del NPOx-Et y NPOx-B <i>in vitro</i> sobre la viabilidad de cultivos celulares.	52
3.5 Determinación de la toxicidad oral aguda del NPOx-Et y NPOx-B.	55
3.6 Efecto tripanomicida de los esteres etílico y bencílico del ácido N-propil oxámico <i>in vivo</i> .	56
3.6.1 Efecto tripanomicida del NPOx-Et y NPOx-B administrados a corto plazo.	58
3.6.2 Efecto tripanomicida del NPOx-Et y NPOx-B administrados a largo plazo.	62
4. DISCUSIÓN	67
5. CONCLUSIONES	75
6. PERSPECTIVAS	76
7. REFERENCIAS Y DIRECCIONES ELECTRÓNICAS	77

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por *Trypanosoma cruzi*. Los fármacos disponibles para el tratamiento de esta enfermedad: Nifurtimox (Nf) y Benznidazol (Bz), son poco efectivos sobre la fase crónica de la enfermedad y presentan efectos altamente tóxicos. La búsqueda de nuevos blancos farmacológicos para el tratamiento de esta enfermedad ha apuntado a la glicólisis como una ruta metabólica blanco para su desarrollo, ya que la fase infectiva y circulante del parásito prefiere la glucosa como fuente para la obtención de ATP. La glicólisis es una ruta anaeróbica de metabolismo de la glucosa donde el agente oxidante es el NAD^+ . En *T. cruzi* la α -hidroxiácido deshidrogenasa (α -HADH) convierte al α -cetocaproato en α -hidroxicaproato utilizando NADH como cofactor promoviendo su reoxidación. Se sintetizó entonces un análogo estructural al sustrato de esta enzima que resultó ser inhibidor competitivo de esta enzima: el ácido N-propil oxámico (NPOx). Sin embargo, este compuesto al ser polar no presenta efecto tripanomicida. Por lo que se sintetizó el éster etílico de este ácido oxámico (NPOx-Et) que actúa como profármaco, es decir, debe ser hidrolizado por la esterasas del parásito para producir *in situ* el NPOx y así obtener el efecto tripanomicida esperado. El objetivo principal de este trabajo es comparar el efecto tripanomicida *in vivo* y sobre el metabolismo energético del parásito del NPOx-Et con el éster bencílico del ácido N-propil oxámico (NPOx-B) que es más hidrofóbico que el NPOx-Et y que al hidrolizarse este derivado bencílico se produce *in situ* el alcohol bencílico. En este trabajo se demostró la actividad tripanomicida del alcohol bencílico (B-OH) lo cual indica que la presencia de éste aumenta la actividad tripanomicida del NPOx y que el NPOx-B actúa como un profármaco acarreador de dos compuestos tripanomicidas: el NPOx y B-OH. Así mismo, se corroboró la incorporación del NPOx-B al espacio intracelular de *T. cruzi* determinando su concentración en sobrenadantes de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* con respecto al tiempo. Por otro lado, se comprobó que la acción del NPOx-B sobre la disminución de las concentraciones intracelulares de NAD^+ y ATP fue mayor a la producida por el NPOx-Et, lo cual correlaciona con la disminución en la viabilidad de cultivos de epimastigotes de las cepas NINOA e INC-5 de *T. cruzi*, lo que indica que la actividad tripanomicida de estos oxamatos es a través del metabolismo energético. De igual modo, la actividad tripanomicida *in vivo* sobre la parasitemia y los nidos de amastigotes fue mayor con el NPOx-B en comparación con el NPOx-Et en ratones infectados con la cepas NINOA e INC-5 de *T. cruzi*, debido a que el derivado bencílico es más hidrofóbico que el etílico y es capaz de librar con mayor facilidad las barreras biológicas. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el NPOx-B podría usarse como un profármaco para el tratamiento de la enfermedad de Chagas con la ventaja de ser poco tóxico ($\text{DL}_{50} > 2\text{g/Kg}$). sobre los fármacos de referencia Nf y Bz.

ABSTRACT

Chagas's disease is a parasitosis caused by *Trypanosoma cruzi*. The currently available drugs for treatment of this disease, Nifurtimox (Nf) and Benznidazole (Bz), besides being little effective on the chronic phase of the disease, have strong toxic effects. The search of new pharmacological targets for the treatment of this illness has pointed out the glycolysis as a metabolic target pathway to develop them, because the infective bloodstream phase of this parasite prefers glucose as main carbon source to the ATP production. Glycolysis is an anaerobic glucose metabolic pathway in which NAD^+ is the oxidant agent. In *T. cruzi* the α -hydroxyacid dehydrogenase (α -HADH) presents activity against α -cetocaproate producing α -hydroxycaproate using NADH as cofactor promoting its reoxidation. The N-propyl oxamic acid (NPOx) was synthesized as a structural analog of this substrate, and turned out to be a competitive inhibitor of this enzyme. However, because of its polarity, this compound is **was** incapable to have trypanocidal effect. Therefore, the ethylic ester of this acid (NPOx-Et) had to be synthesized. This ester acts as a prodrug, it means, that it must be hydrolyzed by the parasite esterases to produce NPOx *in situ* in order to obtain the expected trypanocidal effect. The main objective of this work is the comparison of NPOx-Et and NPOx-B on the *in vivo* trypanocidal effect and on the energetic metabolism. The NPOx-B and NPOx-Et differ in the polarity and in the fact that the NPOx-B hydrolysis product is benzyl alcohol (B-OH). The trypanocidal effect of B-OH is confirmed in this paper, and it indicates that the presence of this compound could increase the NPOx trypanocidal activity, and that the NPOx-B is acting as a carrier prodrug of two trypanocidal compounds: NPOx and B-OH. Furthermore, the intracellular incorporation of NPOx-B was confirmed by quantification of this compound on treated cultured epimastigotes supernatant. This incorporation was done in a time dependent manner. On the other hand the NPOx-B showed higher activity on depletion of intracellular concentrations of NAD^+ and ATP in comparison with NPOx-Et. These results correlate with the epimastigotes viability decrease and demonstrate that the trypanocidal activity of these oxamates is a consequence of the energy metabolism decrease of this parasite. In addition, *in vivo* trypanocidal activity of NPOx-B on parasitaemia and amastigote nests was greater than NPOx-Et on NINOA or INC-5 acute infected mice. This agrees with the NPOx-B hydrophobicity that allows it to cross biological barriers. The results obtained in this work suggest that NPOx-B could be used as a prodrug to the Chagas's disease treatment having a lower toxicity ($\text{LD}_{50} > 2\text{g/kg}$) as an advantage over both reference drugs, Nf and Bz.

ABREVIATURAS

α -HADH	Alfa hidroxiaácido deshidrogenasa
ADH	Alcohol deshidrogenasa
B-OH	Alcohol bencílico
Bz	Benznidazol
BHI	Brain Heart Infussion
CDC	Centers for disease control and prevention
CENA VECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
DL ₅₀	Dosis letal al cincuenta porciento
D-HicDH	D-hidroxi-isocaproato deshidrogenasa
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNDi	Drug Neglected Diseases initiative
DTT	Ditiotreitól
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
DAF	Diacetato de fluoresceína
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanosulfónico
LDH	Lactato deshidrogenasa
<i>Log P</i>	Coeficiente de partición octano/agua
MEM	Minimum Essential Medium
MSF	Médicos sin fronteras
Nf	Nifurtimox
NPOx	Ácido N-propil oxámico
NPOx -B	Éster bencílico del ácido N-propil oxámico
NPOx -Et	Éster etílico del ácido N-propil oxámico
NTD	Neglected Tropical diseases
PAHO	Pan American Health Organization
PI	Yoduro de propidio
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i> .
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i> .
TDR	Tropical disease research
WHO	World Health Organization
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Casos reportados de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana hasta el 2004.	4
Figura 2. Tasa de casos reportados de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana en el 2006	4
Figura 3. Distribución geográfica de las especies de vectores de la enfermedad de Chagas, reportados en la República Mexicana hasta el 2004	8
Figura 4. Estructuras químicas del Benznidazol y Nifurtimox.	14
Figura 5. Mecanismos moleculares de la invasión celular por <i>Trypanosoma cruzi</i> .	18
Figura 6. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> incluyendo sus huéspedes y las fases en que es factible hacer un diagnóstico.	19
Figura 7. Estadios morfológicos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	20
Figura 8. Ruta glicolítica de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	22
Figura 9. Sitio de unión al sustrato de la α -HADH	23
Figura 10. Esquema de la lanzadera en la que interviene la α -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	24
Figura 11. Reacciones catalizadas por la α -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
Figura 12. Estructuras químicas del ácido α -cetocaproico y sus análogos estructurales.	26
Figura 13. Mecanismo propuesto para el posible efecto tripanomicida del éster bencílico del ácido N-propil oxámico.	28
Figura 14. Espectro de absorción de UV del NPOx-B y DMSO	41

Figura 15. Micrografías representativas del efecto del alcohol bencílico 44
sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa NINOA de *T. cruzi*

Figura 16. Micrografías representativas del efecto del NPOx-Et y NPOx-B 53
sobre la viabilidad de células Vero.

Figura 17. Micrografías representativas de cortes del músculo cardíaco 65
que muestran los nidos de amastigotes presentes en este tejido en ratones
infectados con la cepa NINOA de *T. cruzi*,

Figura 18. Micrografías representativas de cortes de músculo esquelético 66
que muestran los nidos de amastigotes presentes en este tejido en ratones
infectados con la cepa NINOA de *T. cruzi*.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Decremento de la incidencia de la enfermedad de Chagas. 5

Tabla 2. Características biológicas de las cepas NINOA e INC-5 de *T. cruzi*. 57

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva tipo de ATP.	35
Gráfica 2. Curva tipo del NPOx-B	42
Gráfica 3. Determinación del NPOx-B en sobrenadantes de cultivos de epimastigotes con respecto al tiempo	42
Gráfica 4. Efecto del alcohol bencílico sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa NINOA de <i>T. cruzi</i> .	43
Gráfica 5. Efecto del alcohol bencílico sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa INC-5 de <i>T. cruzi</i> .	44
Gráfica 6. Efecto comparativo del alcohol bencílico y el NPOx-B sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa NINOA. de <i>T. cruzi</i>	45
Gráfica 7. Efecto comparativo del alcohol bencílico y el NPOx-B sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa INC-5 de <i>T. cruzi</i>	46
Gráfica 8. Efecto de los ésteres bencílico y etílico del ácido N-propil oxámico sobre los niveles intracelulares de ATP en epimastigotes de la cepa INC-5 de <i>T. cruzi</i> .	47
Gráfica 9. Efecto de los ésteres bencílico y etílico del ácido N-propil oxámico sobre los niveles intracelulares de ATP en epimastigotes de la cepa NINOA de <i>T. cruzi</i> .	48
Gráfica 10. Correlación del porcentaje de viabilidad de epimastigotes de la cepa NINOA de <i>T. cruzi</i> contra el porcentaje intracelular de ATP.	49
Gráfica 11. Correlación del porcentaje de viabilidad de epimastigotes de la cepa INC-5 de <i>T. cruzi</i> contra el porcentaje intracelular de ATP.	49
Gráfica 12. Efecto de los ésteres bencílico y etílico del ácido N-propil oxámico sobre la concentración intracelular de NAD ⁺ en epimastigotes de la cepa INC-5 de <i>T. cruzi</i> .	42

Gráfica 13. Efecto de los ésteres bencílico y etílico del ácido N-propil oxámico sobre la concentración intracelular de NAD ⁺ en epimastigotes de la cepa NINOA de <i>T. cruzi</i> .	51
Gráfica 14. Correlación del porcentaje de viabilidad de epimastigotes de la cepa NINOA de <i>T. cruzi</i> contra el porcentaje intracelular de NAD ⁺ .	52
Gráfica 15. Correlación del porcentaje de viabilidad de epimastigotes de la cepa INC-5 de <i>T. cruzi</i> contra el porcentaje intracelular de NAD ⁺ .	52
Gráfica 16. Efecto del NPOx-Et sobre la viabilidad de células Vero	54
Gráfica 17. Efecto del NPOx-B sobre la viabilidad de células Vero.	54
Gráfica 18. Curva dosis respuesta (mortalidad) producida por el NPOx-Et	55
Gráfica 19. Curva de logaritmo de la dosis contra unidades probits de NPOx-Et.	56
Gráfica 20. Curva de parasitemia de ratones infectados con la cepa NINOA de <i>T. cruzi</i>	57
Gráfica 21. Curva de parasitemia de ratones infectados con la cepa INC-5 de <i>T. cruzi</i>	58
Gráfica 22. Efecto de los diferentes compuestos sobre la parasitemia de ratones infectados con la cepa NINOA de <i>T. cruzi</i> .	59
Gráfica 23. Efecto de los diferentes compuestos sobre la parasitemia de ratones infectados con la cepa INC-5 de <i>T. cruzi</i>	60
Gráfica 24. Curvas de parasitemia de ratones infectados con la cepa INC-5 de <i>T. cruzi</i> bajo tratamiento con los diferentes compuestos.	62
Gráfica 25. Curvas de parasitemia de ratones infectados con la cepa INC-5 de <i>T. cruzi</i> bajo tratamiento con los diferentes compuestos.	62

Gráfica 26. Nidos de amastigotes presentes en músculo.	64
Gráfica 27. Nidos de amastigotes presentes en músculo.	64

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una condición clínica asociada a la infección por *Trypanosoma cruzi*. El pionero en el estudio de esta enfermedad fue el Dr. Carlos Chagas, un médico brasileño del Instituto Oswaldo Cruz en Rio de Janeiro Brasil. Él describió la presencia de epimastigotes (forma replicativa) y de tripomastigotes metacíclicos en las porciones anterior y posterior, respectivamente, del intestino de *Pastrogngylus megistus*, una chiche hematófaga que fue capturada en una vivienda humana en la región de Minas Gerais, Brasil en 1909. Posteriormente reportó, por examen microscópico directo, la presencia de tripomastigotes en la sangre de un mamífero y más tarde en sangre periférica de una persona que presentaba fiebre de origen desconocido. Desde ese momento, se ha reportado la presencia de esta enfermedad a lo largo del Norte, Centro y el Sur de América, por lo que es conocida como tripanosomiasis americana (Moncayo, 2007).

Según el último informe de la Organización Mundial de la Salud, 10 millones de personas están infectadas con *Trypanosoma cruzi* y se estima que la población que se encuentra actualmente en riesgo de contraer esta enfermedad es de 25 millones (WHO, 2010), y de éstos, entre 6-8 millones están en riesgo de desarrollar las manifestaciones clínicas de la etapa clínica produciendo la muerte especialmente en niños y personas inmunocomprometidas. Más del 30% de las personas infectadas presentan alteraciones cardiacas y más del 10% presentan alteraciones digestivas, neuronales o una mezcla de ellas (WHO, 2010). Se presentan entre 10,000-20,000 muertes por año y sigue siendo considerada como la segunda enfermedad con mayor peso dentro de las enfermedades tropicales en el continente americano (WHO/TDR, 2007).

El impacto que presenta esta enfermedad, involucra la baja productividad laboral, la incapacidad física y la muerte. Esta afecta aproximadamente a 670,000 personas anualmente (PAHO, 2006) por lo que ha sido catalogada como una de las

enfermedades causadas por parásitos más serias de Latinoamérica. (WHO/TDR, 2007). Esto, tan sólo en Brasil corresponde a una pérdida de 1.3 billones de dólares anualmente. (Moncayo, 2006). Por ejemplo, en 1995 se estimó una pérdida de 8,156 millones de dólares relacionada con la muerte o discapacidad producida por esta enfermedad, lo que equivale al 2.5% de la deuda externa de América Latina. Se estima que la discapacidad provocada por esta enfermedad provoca la pérdida de 0.7 millones de dólares por año, por lo que se encuentra dentro de las seis enfermedades tropicales más importantes del mundo (Paredes *et al.*, 2007).

Actualmente la enfermedad de Chagas ha sido englobada por la Organización Mundial de la Salud dentro de un grupo de enfermedades infecciosas relacionadas con la pobreza presente en países de América Latina y del Caribe denominada NTD (por sus siglas en inglés neglected tropical diseases) (Hotez *et al.*, 2008). Esta enfermedad asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda que se encuentra en las áreas rurales de todo el continente latinoamericano, está considerada como la enfermedad parasitaria con mayor carga económica en América Latina debido a su prolongada cronicidad. En general, los programas de control han centrado sus presupuestos y sus estrategias hacia la eliminación de los insectos vectores más asociados al hábitat humano, y el paciente infectado ha sido relegado a un segundo plano (PAHO, 2008).

En México, existen regiones endémicas como son los estados de: Morelos, Oaxaca, Jalisco, Hidalgo, Nayarit, Yucatán y Chiapas, en este último estado se han presentado reportes de comunidades con hasta el 30% de la población infectada (Lozano *et al.*, 2008). Así como, en el 82.5% de los pacientes con falla cardiaca congestiva y el 17 % de los donadores de sangre en un hospital de la selva Lancandona en este estado resultaron seropositivos para la enfermedad de Chagas (Capps y Abbad, 2004). Aunque la norma oficial mexicana vigente desde 1993 (NOM-003-SSA2-1993), contempla la búsqueda de *Trypanosoma cruzi* en la sangre para donación, recientemente se han publicado la seroprevalencia de anticuerpos contra este parásito en sangre de donadores en varios estados de la República Mexicana (Malagón, 2010, Serrano *et al.*, 2009; Luqueti *et al.*, 2009; Galavíz *et al.*, 2009)

En términos globales, la literatura reporta casos de infección en todos los estados de la República Mexicana. En distintas encuestas epidemiológicas que se han realizado hasta el 2004 a lo largo del territorio nacional, de una muestra total de 288,634 personas, se han encontrado 16,979 seropositivos, lo que representa una tasa de prevalencia de 5.8% (Figura 1; Cruz y Pickering, 2006).

De acuerdo con el último informe epidemiológico del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades de la Secretaría de Salud (CENAVECE), los estados de la República con la mayor incidencia en el 2006 fueron Morelos con 63 casos y una tasa de 3.63 por cada 100 000 habitantes; Quintana Roo con 27 casos y una tasa de 2.39 por 100 000 habitantes; Veracruz 141 casos y una de tasa de 1.93 por cada 100 000 habitantes, Aguascalientes, Baja California, Coahuila, Colima, Chihuahua, Hidalgo, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas no presentaron casos durante este año (Figura 2).

Las tendencias epidemiológicas en las últimas dos décadas muestran claramente una reducción de la transmisión vectorial (Tabla 1) debido a los programas de control, lo que ha contribuido a la disminución de la incidencia anual de la enfermedad en todo el continente (Gascón *et al.*, 2008). Sin embargo, aunque se considera a la enfermedad de Chagas como exclusiva de países pobres, la migración ha provocado que se presenten casos en países donde la enfermedad no es endémica, sobre todo en países con alta población de personas provenientes de Latinoamérica como Estados Unidos, España y Francia (Salmanca *et al.*, 2009). Alrededor de 8 de cada 250 individuos (3%) provenientes de América Central, residentes de Brooklyn y Queens, Nueva York, se han encontrado como seropositivos para anticuerpos contra *T. cruzi* y en proporción similar, inmigrantes nicaragüenses residentes en Washington D.C. se han encontrado positivos (Teixeira *et al.*, 2006). Por lo anterior, la FDA en Estados Unidos ha implementado la prueba diagnóstica para enfermedad de Chagas a donadores de sangre (Tarleton *et al.*, 2007).

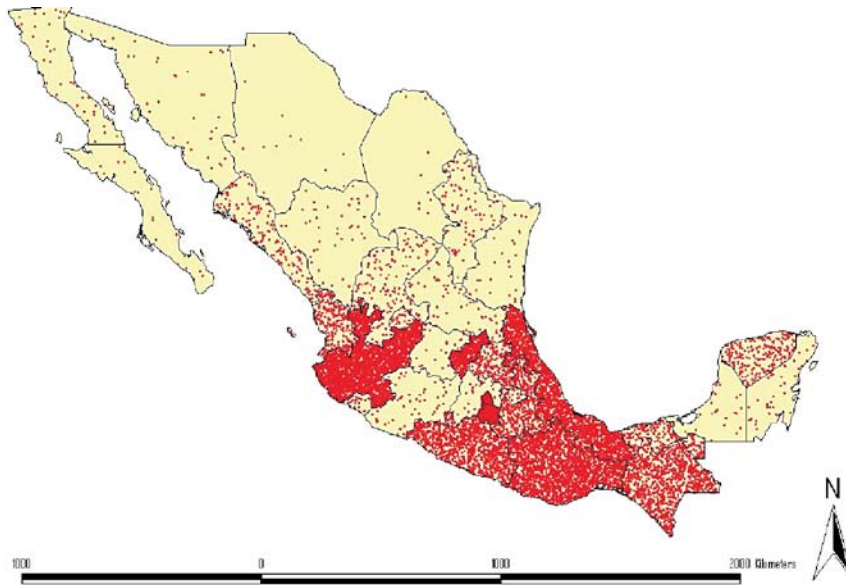


Figura 1. Casos reportados de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana hasta el 2004. Cada punto (rojo) indica un caso reportado (Cruz y Pickering, 2006).

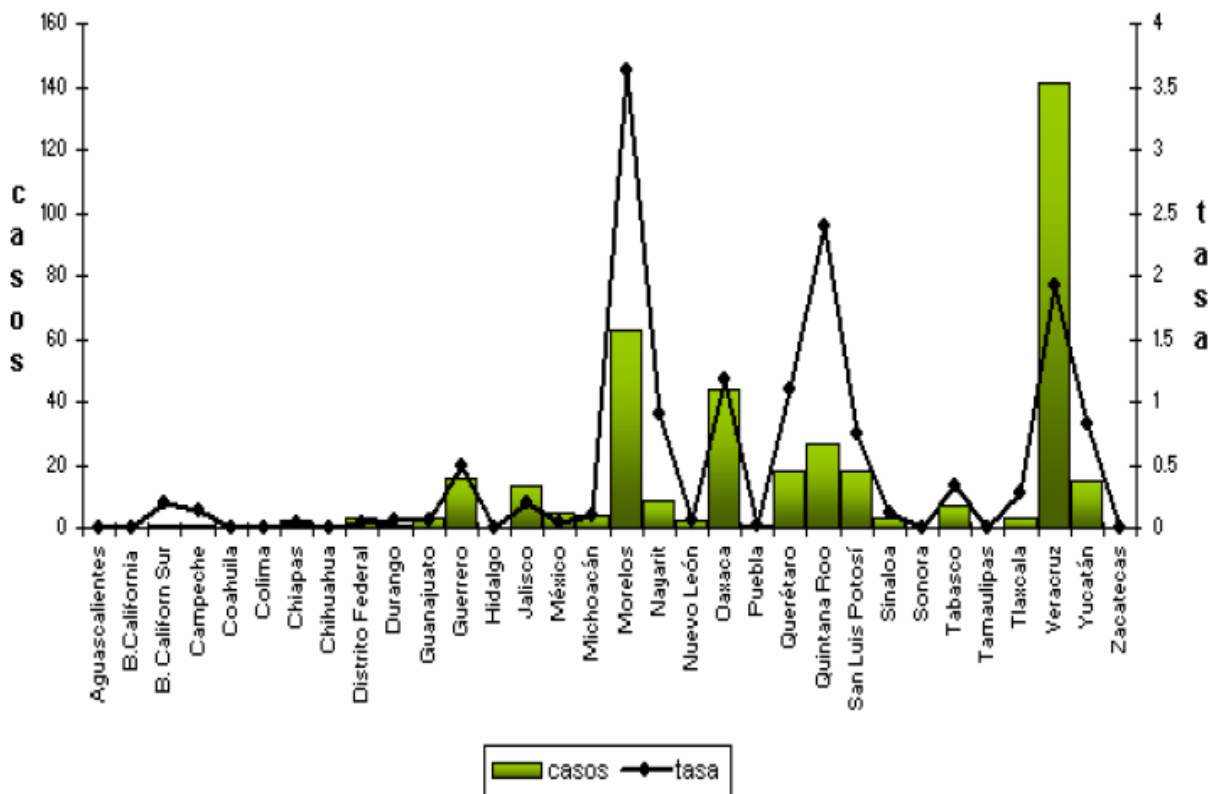


Figura 2. Tasa de casos reportados de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana en el 2006. La tasa está calculada por número de casos/100 000 habitantes. Fuente anuarios de morbilidad 2006/Dirección General Adjunta/secretaria de Salud (CENAVECE, 2008).

Tabla 1. Decremento de la incidencia de la enfermedad de Chagas. Este decremento es consecuencia de la aplicación de programas de control de la transmisión (WHO/TDR 2007).

Parámetro epidemiológico	1990	2000	2006
Muertes anuales	>45 000	21 000	12 500
Casos humanos	30 millones	18 millones	15 millones
Nuevos casos por año	700 000	200 000	41 200
Población en riesgo	100 millones	40 millones	28 millones
Países endémicos	21	21	21

Según el reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas realizado en Argentina en abril de 2005 la tripanosomiasis americana es una zoonosis muy compleja que está presente en todo el territorio de Sudamérica, Centroamérica y México, y continúa representando una grave amenaza para la salud de los países de la región. El parásito se presenta en una gran variedad de cepas e infecta 150 especies de 24 familias de animales domésticos y silvestres. La existencia de la enfermedad de Chagas humana es un hecho puramente accidental; en la medida en que el hombre fue entrando en contacto con los focos naturales y provocó desequilibrio ecológicos, forzó a los triatominos infectados a ocupar viviendas humanas, se llevó a cabo el proceso de domiciliación y, así, encontraron refugio y suficiente alimento en la sangre humana y en los animales domésticos. De esta manera, entra el hombre a formar parte activa de la cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas (PAHO, 2008).

El agente etiológico de esta enfermedad es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* un protozooario hematoflagelado (clase Zoomastigophorea, familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida), los organismos que entran dentro de esta clasificación son uniflagelados y presentan un cinetoplasto que corresponde a una red fibrilar de DNA contenido dentro de una única mitocondria ó mitocondrion (Hannaert y Bringaud,

2003). Utilizando análisis de isoenzimas, actividad del promotor del RNA ribosomal y secuencia de genes mini-exon se han obtenido evidencias de que *T. cruzi* no pertenece a una sola población, sino que corresponde a dos subgrupos genéticos altamente divergentes, designados el linaje I y II (Zafra *et al.*, 2008). El linaje I se encuentra predominantemente relacionado al ciclo de vida doméstico, mientras que el linaje II está relacionado al ciclo de vida silvestre. El ciclo de vida de este parásito, involucra el paso de un insecto hematófago (conocidas comúnmente como chiches hociconas), y un vertebrado que generalmente es un mamífero, presentando diferentes estadios en ambos huéspedes:

El tripomastigote (la forma circulante flagelada que penetra a las células del huésped) es ingerido por el insecto vector. Éste se diferencia en su forma proliferativa de epimastigote al llegar al intestino y más tarde se transforma a tripomastigote metacíclico. Esta última es la forma infectiva transmitida al vertebrado con la consecuente diferenciación a amastigote, el cual es intracelular y de forma esférica que mediante varios ciclos reproductivos se convierte de nuevo en tripomastigote; la forma responsable de la diseminación de la infección (CDC, 2004).

1.1.1 Transmisión

La transmisión de la enfermedad ocurre en la mayoría de los casos mediante el insecto vector (80-90%), en menor proporción por transfusión sanguínea (5-20%); en México entre 1994 y 1996 se detectó una prevalencia de infección chagásica en los centros estatales de transfusión de México igual a 1.5% (Coura, 2007) y por ruta congénita; 0.5-8% (Punukollu *et al.*, 2007). Adicionalmente, puede ser transmitido por trasplante de órganos contaminados o por auto-inoculación accidental en laboratorios y hospitales (Barcan y Luna, 2005). Sin embargo, recientemente se ha vuelto a considerar a la ingesta de alimentos contaminados con este parásito como una ruta importante para la transmisión de la enfermedad de Chagas (Calvo, *et al.*;1992, Pereira *et al.*, 2009). La presencia de la tripanosomiasis americana en el continente coincide con la distribución del vector, desde el paralelo 42°Norte en el

Sur de Estados Unidos hasta el paralelo 42° sur en la Patagonia, Argentina (Teixeira *et al.*, 2006).

Al menos 40 especies de triatomos pueden albergar a *T. cruzi*, por lo tanto, todos ellos son potenciales transmisores de la infección. Las principales especies que se han reportado como transmisora de *T. cruzi* a mamíferos son *Triatoma* spp. las cuales están adaptadas a las zonas rurales y domiciliarias de los climas secos presentes en Centro y Sudamérica. Estas especies se han asociado a 10-12 millones de casos de la enfermedad de Chagas en humanos. El siguiente género en importancia epidemiológica es *Rhodnius* spp, habitante de climas húmedos tropicales y las especies ubicuas *Pastrongylus* sp. (Coura, 2007).

En México, se han encontrado aproximadamente 34 especies de triatomos (Martínez-Ibarra *et al.*, 2008), comprendidas en 7 géneros, algunas con amplia distribución en la República Mexicana y otras con menor presencia (Alejandre *et al.*, 1999). De estas especies al menos en 21 se ha identificado la infección por *T. cruzi*. La figura 3 muestra la distribución geográfica de las especies de triatomos que se han reportado hasta 2004 a lo largo de la República Mexicana (Becerril *et al.*, 2007).

En cuanto a la transmisión por transfusión sanguínea en los últimos años, los bancos de sangre en muchos países de América, se han mantenido libres de la presencia del parásito debido a la selección apropiada de donadores de sangre, el uso de pruebas de diagnóstico sensibles y sistemas de salud de calidad (Schmunis y Cruz, 2005). Mientras que la transmisión por vía congénita ha sido reportada en países de Latinoamérica donde la enfermedad de Chagas prevalece en individuos en edad reproductiva, que van desde el 2.5% en la zona noreste de Brasil hasta el 9.5% en Bolivia (Teixeira *et al.*, 2006).

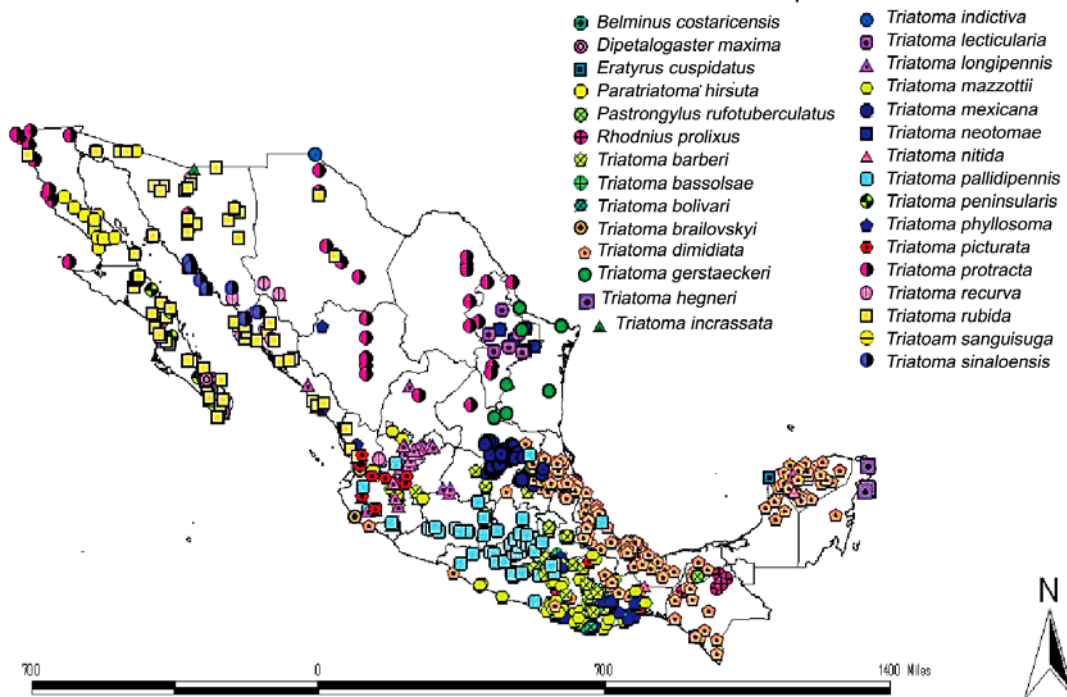


Figura 3. Distribución geográfica de las especies de vectores de la enfermedad de Chagas, reportados en la República Mexicana hasta el 2004. La más de 30 especies de vectores reportadas hasta el 2004 en la República Mexicana se muestran con puntos de diferentes colores (Cruz y Pickering, 2006).

1.1.2 Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas

En humanos, después de la infección y un subsiguiente período de incubación, empiezan a presentarse las manifestaciones clínicas. Se distinguen tres fases de la enfermedad bien diferenciadas:

- a) **Fase aguda** cuya duración es de 2-4 meses y aproximadamente sólo el 5% de los infectados manifiestan sintomatología. La mortalidad durante esta fase de la infección está entre 1:2500 -1:5000 en su mayoría de niños y ancianos. La muerte es causada por miocarditis o meningoencefalitis (Muñoz *et al.*, 2006).

- b) **Fase indeterminada** o infección subclínica, se distingue porque los pacientes cursan asintomáticos lo que hace difícil el diagnóstico durante esta fase. Se presenta en un 50-60% de los casos y progresa durante periodos largos e incluso el paciente puede permanecer en esta fase durante toda su vida (Bazán *et al.*, 2008).
- c) **Fase crónica** afecta sobre todo la calidad de vida del paciente debido al deterioro en el funcionamiento de los tejidos afectados por la infección como son; corazón, intestino y sistema nervioso central; se presenta en un periodo de 10-20 años después de la infección. Aproximadamente, 30-40% de los casos presentan esta fase, de los cuales un 60-70% mueren repentinamente (Bazán *et al.*, 2008). La población con enfermedad de Chagas crónica se ve afectada principalmente en el músculo cardíaco (94.5%), el resto presenta crecimiento de algunos otros órganos digestivos como el esófago y colon (Rassi *et al.*, 2006). La enfermedad de Chagas afecta igualmente a ambos sexos. Recientemente, se ha investigado a la ceguera nocturna como un nuevo síntoma clínico en pacientes con enfermedad de Chagas crónica y la disfunción retinal ha sido asociada a la reacción cruzada de los anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* contra la rodopsina (Duschak y Couto, 2007).

Después de la inoculación del parásito, son frecuentes el signo de Romaña (inflamación de los párpados de un ojo) y el chagoma de inoculación (edema o roncha en la piel) los cuales son característicos de procesos inflamatorios presentes en reacciones de hipersensibilidad retardada. El parásito invade al huésped y destruye las células de tejido muscular cardíaco, fibra muscular lisa y células del sistema fagocitario mononuclear (macrófagos). El periodo inicial de infección está caracterizado por parasitemia intensa; los signos y síntomas son transitorios debido a la respuesta inmune del hospedero y por un cuadro febril (Muñoz *et al.*, 2006). En la fase aguda los síntomas pueden ser moderados o ausentes, se observan más en los niños que en los adultos; dos o tres semanas después se presenta linfadenitis y edema generalizado, dolor muscular, vómito y diarrea, bronquitis y miocarditis de intensidad variable: La fiebre es alta (intermitente, remitente o continua), puede

haber hepato-esplenomegalia, mialgias y eccema eritematoso localizado (Punukollu *et al.*, 2007).

Los exámenes de laboratorio muestran anemia, linfocitosis, monocitosis e incremento de los niveles de anticuerpos IgM. La fase aguda de la enfermedad de Chagas termina en pocas semanas con la recuperación del paciente, o bien comienza con el estado crónico de la infección e inclusive la muerte. La fase indeterminada; se caracteriza por positividad serológica, en individuos asintomáticos con electrocardiograma (ECG) y radiología normal para corazón, esófago y colon, respectivamente, aunque pueden presentarse periodos variables de remisión, exacerbación marcada por la fiebre y la aparición de tripomastigotes en la sangre. La forma clínica en la fase crónica se caracteriza por cardiopatía formación de “megas”: mega esófago (esofagopatía) y megacolon (colopatía), se presentan alteraciones del sistema nervioso central y bronquioectasias (dilatación crónica de los bronquios). La glomerulonefritis por *T. cruzi*, es el resultado de depósitos de complejos inmunes en las membranas basales de los túbulos renales (Muñoz *et al.*, 2006).

No se sabe que *T. cruzi* produzca toxinas o factores citotóxicos por lo que la mayoría de las consecuencias de la infección se deben a la reacción inmunitaria del huésped (Coura, 2007).

1.2 Mecanismos de evasión de sistema inmunológico empleados por *Trypanosoma cruzi*.

Los linfocitos Th1 CD4+ son los encargados de la protección inmunológica parcial contra *T. cruzi* (Hoft *et al.*, 2000). Mientras que los linfocitos T CD8+, el interferón (INF) y los macrófagos son elementos importantes que controlan la replicación del parásito durante la fase aguda de la infección. Durante la fase crónica de la enfermedad, los anticuerpos parásito específicos que fijan complemento y lisan los tripomastigotes sanguíneos se consideran las moléculas que permiten la latencia de la infección (Goto *et al.*, 2008). En el caso de enfermedad cardíaca de Chagas

predominan los linfocitos T CD8+, los cuales son prácticamente el doble que los T CD4+. Mientras que en la forma gastrointestinal existe un decremento absoluto en el número de linfocitos CD3+ y en linfocitos B CD19+, así como una inversión en la proporción de linfocitos T CD4/CD8 (Teixeira *et al.*, 2006). La respuesta inmune parcialmente protectora asociada con la resistencia del hospedero a la infección por *T. cruzi* puede estar relacionada con infiltrado inflamatorio severo y patología en el corazón, tracto digestivo y otros tejidos (Gomes *et al.*, 2003). Estos estudios contraindican la producción de una posible vacuna

Por otro lado, en la infección causada por *T. cruzi* se han reportado mecanismos generales que les confieren a estos parásitos la capacidad de evadir los efectos letales del sistema inmunológico del huésped (Teixeira *et al.*, 2006a).

1. Los tripomastigotes de *T. cruzi* producen moléculas que regulan la fijación del complemento. Estos parásitos producen una proteína (Complement regulatory protein; CRP) que mimetiza el efecto de una familia de proteínas CRP que emplea el huésped para prevenir la lisis de sus propias células por la fijación del complemento. *T. cruzi* ha desarrollado este mecanismo que les confiere la capacidad de evitar la lisis (muerte) mediada por fijación del complemento. Lo anterior se ha demostrado plenamente ya que la transfección de epimastigotes (sensibles a la lisis por fijación del complemento) utilizando un plásmido conteniendo el gen específico para CRP presente en tripomastigotes, les confiere resistencia a la lisis por fijación del complemento. Esto demuestra que CRP es uno de los factores responsables de la virulencia de *T. cruzi* (Beucher y Norris, 2008).
2. Otro factor que contribuye a la disminución de la respuesta inmune por los tripomastigotes es la liberación de proteínas, especialmente, una trans-sialidasa (TS) la cual tiene la capacidad de matar las células del sistema inmunológico, activando o acelerando su mecanismo de muerte celular programada o apoptosis. (Ratier *et al.*, 2008)
3. La infección de ratones con *T. cruzi* conduce a una infección aguda, caracterizada por una severa depresión del sistema inmunológico, debido a que estos parásitos liberan al medio moléculas solubles que actúan como

inmunosupresores (Ouaissi y Ouaissi, 2005), que les permiten sobrevivir y proliferar. Afortunadamente esta depresión del sistema inmunológico decrece notablemente cuando el huésped pasa a la fase crónica, ya que esta depresión inmunológica pone en riesgo al paciente de otras infecciones oportunistas.

Es muy probable que esta inmunosupresión temporal ayude al parásito para entrar a las células y alcanzar los compartimentos celulares, lo cual permite el establecimiento de la fase crónica, tanto en animales como en humanos. En el caso de *T. cruzi*, esta fase se caracteriza por la diferenciación de los tripomastigotes en amastigotes, la cual es la fase replicativa en el huésped vertebrado (Ouaissi y Ouaissi, 2005).

1.3 Diagnóstico

El diagnóstico en: a) la fase aguda se establece por la alta parasitemia, incrementos de anticuerpos, anti *T. cruzi* tipo IgM por inmunofluorescencia, detección del parásito en sangre en un frotis de gota gruesa, búsqueda de amastigotes en ganglios y músculo estriado, xenodiagnóstico, entre otros; b) el diagnóstico en la fase indeterminada se establece solamente por serología positiva, de al menos dos técnicas: hemaglutinación indirecta, ELISA, Western blot, inmunofluorescencia y PCR; y c) la fase crónica se diagnostica, mediante las técnicas mencionadas aunadas a estudios electrocardiográficos, radiológicos y ecografía para demostrar cardiopatía, colopatía y esofagopatía. (Schmunis, 2005). Actualmente se recomienda realizar al menos dos pruebas inmunológicas para confirmar la enfermedad de Chagas. (Cruz y Pickering, 2006). Recientemente se ha propuesto la PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de DNA de *T. cruzi* en muestras de sangre periférica como una herramienta no sólo para el diagnóstico, sino para el monitoreo clínico de la reactivación de la enfermedad en pacientes bajo tratamiento farmacológico ó inmunodeficientes. (Duffy *et al.*, 2009)

1.4 Quimioterapia

Debido al impacto de salud mundial que implican las afecciones causadas por tripanosomatidos, recientemente los proyectos de secuenciación del genoma de *T. brucei* (cepa 927) (Berriman *et al.*, 2005), *Leishmania major* (cepa Friedlin) (Ivens *et al.*, 2005) y *T. cruzi* (cepa CL Brener) (El Sayed *et al.*, 2005) han sido completados y estos conocimientos seguramente proveerán de herramientas para identificar nuevas vías específicas y blancos bioquímicos innovadores para el desarrollo de fármacos. Recientemente la asociación de Médicos sin Fronteras ha creado una iniciativa denominada DNDi (Drug for Neglected diseases initiative) cuyo objetivo es crear e incentivar esfuerzos para la Investigación y el Desarrollo de medicamentos que combatan las denominadas enfermedades olvidadas, tales como la enfermedad de Chagas, la leishmaniosis, la enfermedad del sueño y la malaria (<http://www.msf.org>).

Se han probado numerosos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, pero hasta ahora ninguno ha resultado absolutamente eficaz. Estos fármacos se pueden clasificar en los siguientes grupos:

- a) Fármacos con utilidad clínica reconocida: Nifurtimox y Benznidazol.
- b) Fármacos efectivos en modelos experimentales *in vivo*, sin aplicación clínica generalizada: Ketoconazol, itraconazol, alopurinol.
- c) Fármacos efectivos en modelos experimentales con actividad clínica previsible: inhibidores de las vías bioquímicas del *T. cruzi*.
- d) Tripanomicidas *in vitro*: cristal violeta (Apt, 2010).

1.4.1 Nifurtimox (Nf) y Benznidazol (Bz)

El Nifurtimox ó (4-(5-nitrofurfurideno) amino)-tetrahydro-4-4-1,4-tiazina-1-1dióxido) y el Benznidazol (N-bencil-2-nitroimidazol acetamida) se comercializan con los nombres de Lampit y Radanil respectivamente (Figura 4).

El mecanismo de acción del Nifurtimox implica la generación de radicales nitro-anión mediante la acción de nitro-reductasas que en presencia de oxígeno promueven la formación de intermediarios reactivos como H_2O_2 , $\frac{1}{2} O_2^-$ para los cuales el sistema de detoxificación de *T. cruzi* es ineficiente. Por otro lado, el efecto del Benznidazol está más bien relacionado con la unión covalente o algunas otras interacciones de los intermediarios de la nitro-reducción (que no se encuentran en concentraciones lo suficientemente altas como para matar al parásito) con componentes del parásito como DNA, lípidos y proteínas (Wilkinson *et al*, 2008).



Figura 4. Estructuras químicas del Benznidazol (A) y Nifurtimox (B). Ambos fármacos presentan grupos nitro en su estructura química: el Benznidazol un nitroimidazol y el Nifurtimox un nitrofurano.

Los resultados obtenidos con ambos fármacos varían de acuerdo a la fase de la enfermedad, el periodo de tratamiento, la dosis, edad y el origen geográfico de los pacientes. Sin embargo, se han mostrado resultados favorables en la fase aguda de la infección o en la fase crónica temprana (WHO/TDR, 2002).

Los pacientes con manifestaciones clínicas deben recibir tratamiento en especial si se detectan en los primeros cuatro meses de la infección. Este consiste en una dosis de Nf de 8 mg/kg/día en adultos y de 10 mg/kg/día en niños de 30-60 días. Esta cantidad diaria debe ser dividida en tres dosis una antes de cada comida (8h). El Bz debe administrarse en una dosis de 5-10 mg/kg/día durante 60 días repartidas en dos o tres dosis diarias antes de la comida en niños y adultos (Apt, 2010).

Algunos de los efectos colaterales del tratamiento con Nifurtimox son la anorexia, la pérdida de peso, náusea, vómito, cólicos intestinales y diarrea. Por otro lado, debe tomarse en cuenta que la comercialización de Nifurtimox se discontinuó en Brasil y

Argentina desde los años 90's por presentar efectos tóxicos, sobre todo durante el tratamiento crónico de la enfermedad (Paulino *et al.*, 2005). Las reacciones adversas del Benznidazol pueden ser clasificadas en tres grupos: i) hipersensibilidad, dermatitis y erupciones cutáneas, dolor articular y muscular; ii) leucopenia, púrpura trombocitopénica y granulomatosis; iii) polineuropatía dependiente de la dosis. A la dosis terapéutica del Benznidazol (5 mg/kg/día) del 10%- 30% de los pacientes presenta neuropatía, especialmente al finalizar el tratamiento (Apt, 2010).

Existen también reportes de actividad mutagénica y carcinogénica debido al Benznidazol, sobre todo en tratamientos crónicos (Paulino *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que existen cepas resistentes a Bz y Nf sin embargo no existen reportes que muestren una relación entre esta resistencia y la virulencia de las cepas (Apt, 2010).

1.4.2 Otros fármacos sin utilidad clínica reconocida

Otros compuestos que han sido probados para el tratamiento de este padecimiento son el Alopurinol, el cual bloquea la síntesis de novo de nucleótidos de purina debido a que *T. cruzi* es incapaz de sintetizar estos nucleótidos, sino que debe utilizar purinas preformadas en el organismo del huésped.

Los azoles que se utilizan como antimicóticos, los cuales modifican el contenido de esteroides, en particular de ergosterol (esterol cuya presencia en *T. cruzi* es sobresaliente y que es indispensable para la proliferación y viabilidad de este parásito), como el Ketoconazol, Itraconazol y Fluconazol y antineoplásicos como el Taxol (Duschak y Couto, 2007). Sin embargo aún no se han encontrado compuestos lo suficientemente efectivos y selectivos contra el parásito. Además el tratamiento de este padecimiento es prolongado por lo que muchas cepas de *T. cruzi* se han hecho resistentes a los fármacos (Apt, 2010).

1.4.3 Blancos bioquímicos prometedores para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas

Como consecuencia del incremento en el conocimiento de la bioquímica y fisiología del agente etiológico de la enfermedad de Chagas se han buscado blancos bioquímicos que permitan el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad, dentro de los que se encuentran:

- a) Inhibidores de la tripanotona reductasa, la cual representa el sistema único presente en el orden Kinetoplastida para el balance redox de los grupos tiol dentro de la célula (Kahn, 2007).
- b) Inhibidores de cistein-proteasas. La cruzipaina es una catepsina (cistein-proteasa de tipo L) responsable de la mayor actividad proteolítica en todos los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* (Duschak y Couto, 2007).
- c) Alquil-lisofosfolípidos (ALP): Estos compuestos bloquean selectivamente la biosíntesis de fosfatidilcolina en estos parásitos, sin embargo el mecanismo de acción por el cual ejercen su actividad tripanomicida no ha sido completamente elucidado (Duschak y Couto, 2007).
- d) Inhibidores del metabolismo del pirofosfato. Tanto el pirofosfato como los polifosfatos son compuestos de alta energía y en *T. cruzi* son más abundantes incluso que el ATP, por lo que se sugiere que estos compuestos pueden jugar un papel primordial en la sobrevivencia el parásito (Duschak y Couto, 2007).
- e) Inhibidores del la α -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II α (-HADH): los inhibidores de esta enzima juegan un papel fundamental en el metabolismo energético de *T. cruzi* (Chena *et al.*, 2005) el cual se abordará a detalle más adelante.

1.5 *Trypanosoma cruzi*.

1.5.1 Ciclo de vida.

Trypanosoma cruzi cambia de morfología durante su ciclo de vida y en la transmisión del insecto al humano. Presentando tres formas generales, las cuales pueden ser identificables por microscopia óptica en preparaciones teñidas con Giemsa: **tripomastigote** (metacíclico y sanguíneo), **amastigote** y **epimastigote**. Debido a su cambio de forma, este parásito puede adecuarse a medios hostiles y evadir la respuesta inmunológica.

Los tripomastigotes metacíclicos son la forma infectiva que pasan del intestino del insecto a través de la orina o materia fecal y atraviesan la piel o mucosas por medio de abrasiones o soluciones de continuidad (Miles, 2005).

La infección comienza con la penetración de los tripomastigotes metacíclicos en los macrófagos que se encuentran en los tejidos subcutáneos y la dermis. La invasión ocurre después de que el parásito se une a la membrana plasmática del macrofago mediante el reconocimiento de residuos de ácido siálico (Ratier *et al.*, 2008). La invasión celular por fagocitosis/macropinositosis involucra la reorganización de filamentos de actina de la célula huésped para la formación de pseudópodos. Sin embargo, *T.cruzi* puede invadir células no fagocíticas donde se forma una invaginación en la membrana sin la participación de los filamentos de actina para el cual se han propuesto dos mecanismos. El primero depende del aumento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} tanto en la célula huésped como en el parásito lo que promueve el reclutamiento de lisosomas con la consecuente formación de una vacuola parasitófora que permite la entrada del parásito a través de un proceso de endocitosis. En la otra ruta independiente de lisosomas los parásitos entran a la célula a través de invaginaciones en la membrana acumulando fosfatidilinositol trifosfato. Ambos mecanismos producen la formación de una vacuola parasitófora. En esta vacuola los tripomastigotes pierden su flagelo y se redondean formando los amastigotes, también conocidos como esferomastigotes o micromastigotes. Tanto la fusión de la vacuola con los lisosomas como la acción de

otras enzimas como transalidasas o neuraminidasas producidas por el parásito provoca la desintegración de la membrana de la vacuola parasitofora (de Souza *et al.*, 2010). Así los amastigotes en contacto directo con el citoplasma comienzan a dividirse dentro de la célula (Figura 5).

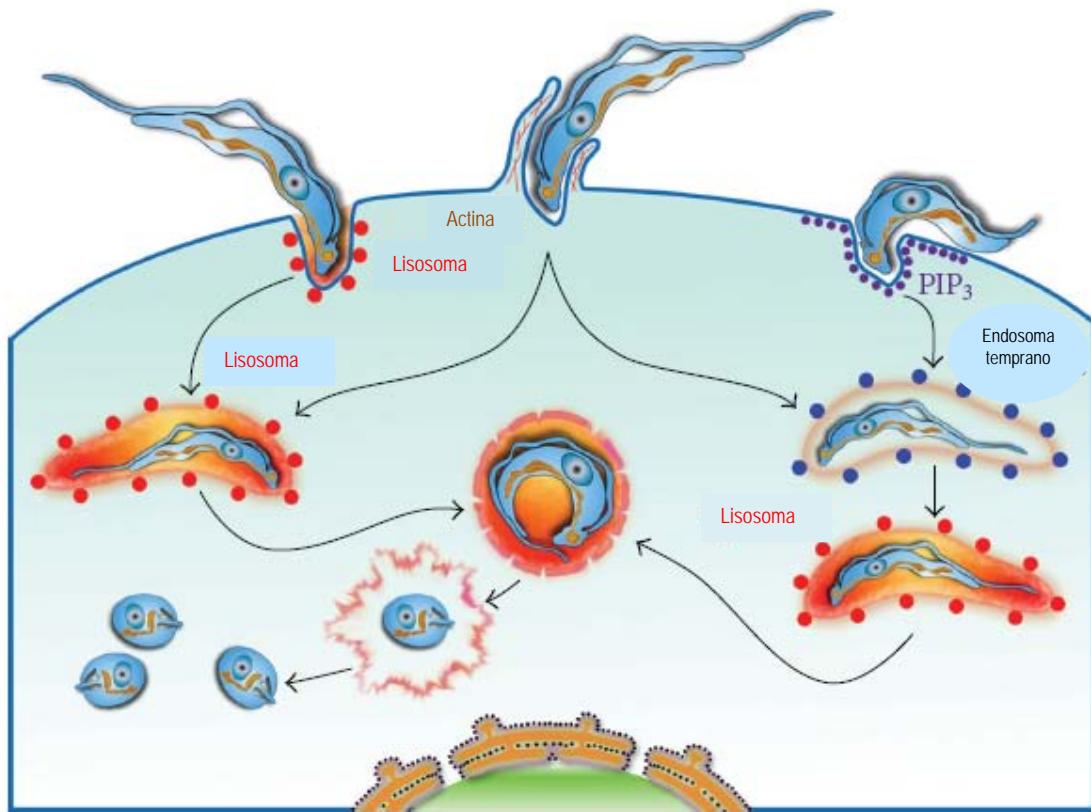


Figura 5. Mecanismos moleculares de la invasión celular por *Trypanosoma cruzi*. En el esquema se representan las tres mecanismos de invasión a la célula huésped que presentan los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. (1) la vía de entrada dependiente de lisosomas, (2) la vía dependiente de actina, (3) una vía independiente de lisosomas a través de invaginaciones en la membrana plasmática que acumulan fosfo-inositol-trifosfato (PIP₃) (de Souza *et al.*, 2010).

Los amastigotes son el estadio intracelular, esférico de 1.50 μm de diámetro donde el cinetoplasto se observa como un cuerpo oscuro cercano al núcleo. Estos carecen de flagelo libre y se replican mediante fisión binaria. Cuando los amastigotes casi llenan la célula toman una forma intermedia, conocida como tripomastigote procíclico, en el cual el cinetoplasto se localiza en la parte anterior al parásito y el flagelo se encuentra libre sin membrana ondulante. Los cuales al lisarse la célula son liberados a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo (Miles, 2005). Los tripomastigotes sanguíneos presentan el cinetoplasto posterior al

núcleo que usualmente está localizado en la zona más posterior del parásito, de aquí sale el flagelo y se dobla hacia adelante a lo largo del cuerpo del parásito, formando una membrana ondulante y emerge en forma libre en su extremo anterior. Su longitud oscila entre 5-25 µm y 2 µm de ancho. Esta forma flagelada promueve la infección de una célula a otra del huésped hasta colonizar músculo o el tejido neural donde se enquistan y forman los nidos de amastigotes, repitiéndose indefinidamente el ciclo de infección (Tyler y Engman, 2001) como se representa en la figura 6. La forma de tripomastigote también puede obtenerse de la fase estacionaria de crecimiento en cultivos axénicos y en la fase líquida de cultivos celulares (Cruz y Pickering, 2006).

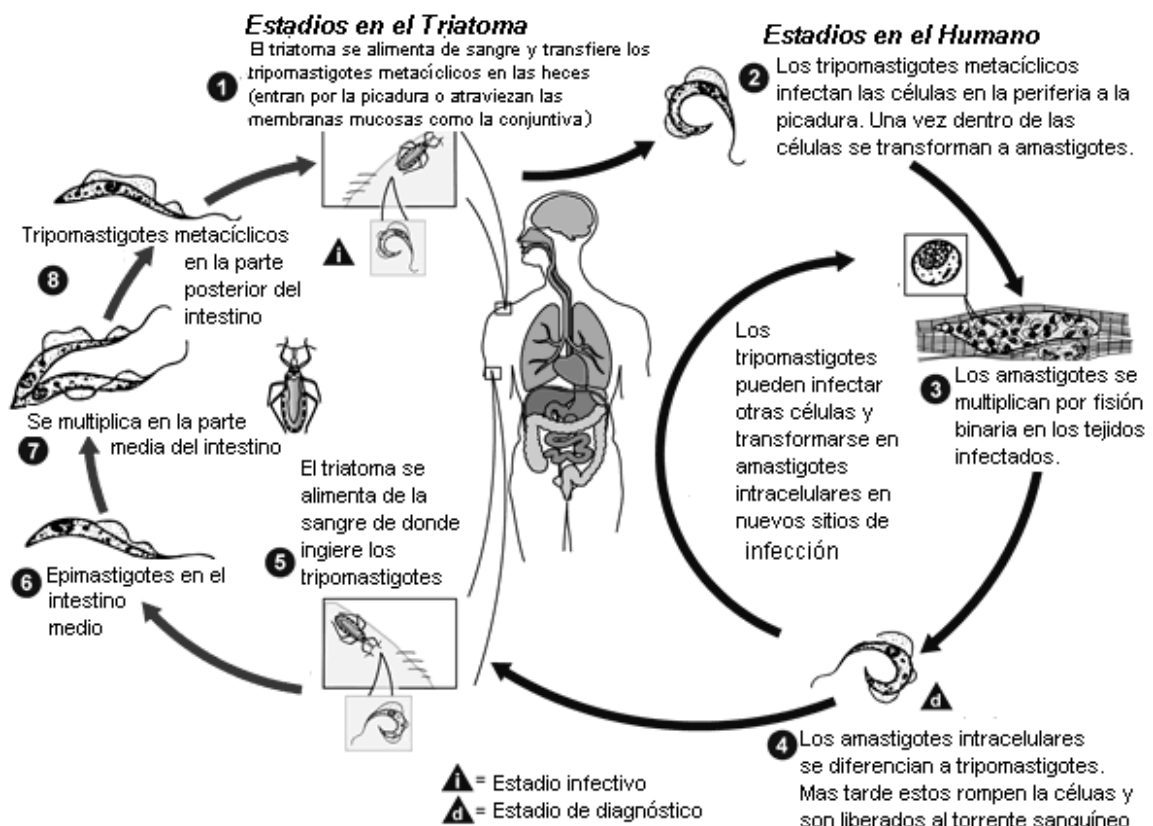


Figura 6. Ciclo de vida de *T. cruzi* incluyendo sus huéspedes y las fases en que es factible hacer un diagnóstico. En este esquema se encuentran numerados los pasos del ciclo de vida y de infección de *T. cruzi*. Se observan los tres estadios morfológicos de *T. cruzi*; epimastigote, tripomastigote y amastigote y en qué tipo de huésped se encuentran. (CDC ,2004).

Los tripomastigotes circulantes son adquiridos por las chinches durante la ingestión por sangre contaminada. Estos tripomastigotes viajan a través del intestino del insecto donde más tarde se convierten en epimastigotes, los cuales, a diferencia de

los tripomastigotes presentan un flagelo unido a la parte central del cuerpo del parásito, un núcleo central y un cinetoplasto (Cruz y Pickering, 2006). Éstos miden entre 1-2 μm de longitud, pero aumentan su tamaño hasta veinte veces más, conforme viajan a través del intestino del insecto hasta que adoptan de nuevo la forma metacíclica de tripomastigote. Este cambio de forma en el insecto tarda entre 16 -17 días y el parásito parece no causar un daño a la chinche (Tyler y Engman, 2001). Los epimastigotes también se encuentran al final de la fase intracelular, cuando el amastigote se transforma en tripomastigote o viceversa (Cruz y Pickering, 2006). Las diferentes morfologías que toma *T. cruzi* durante su ciclo de vida, la localización del núcleo y el cinetoplasto se muestran en la figura 7.

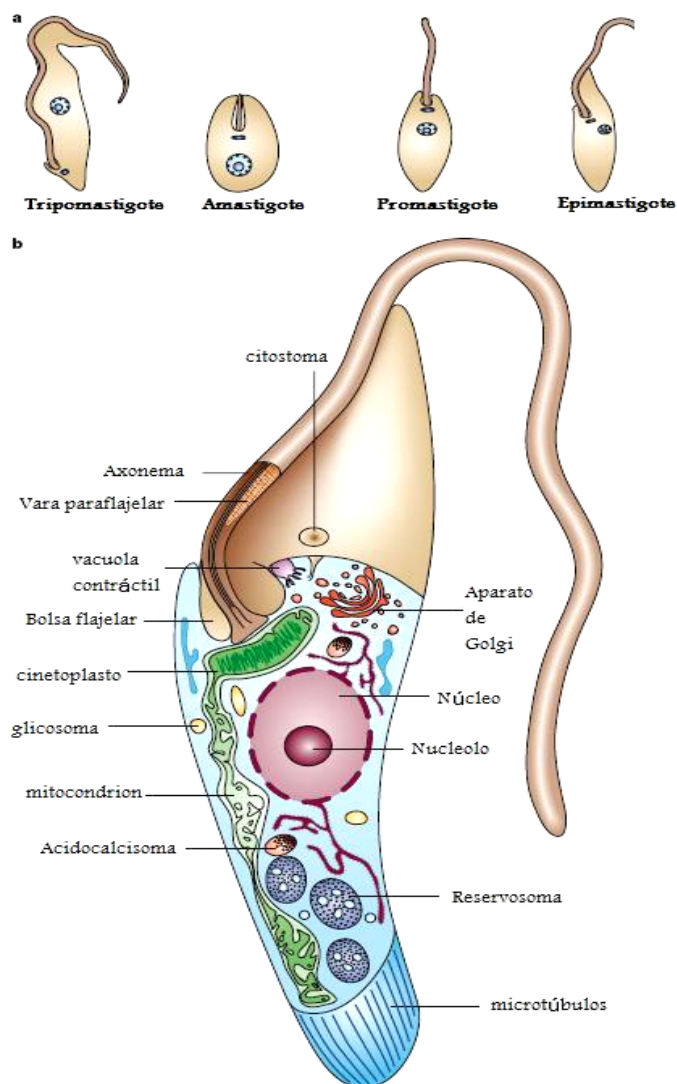


Figura 7. Estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*. a) Principales morfologías de los tripanosomátidos las cuales se diferencian por la forma celular, la presencia de flagelo y la posición del cinetoplasto y el núcleo en el cuerpo basal. b) Representación esquemática longitudinal de un epimastigote de *T. cruzi* donde se encuentran señalados los organelos de este parásito (Do Campo *et al.*, 2005).

1.5.2 Metabolismo energético de *T. cruzi*.

T. cruzi depende de las fuentes de carbono presentes en huésped para su metabolismo energético. En la forma de tripomastigote utilizan la glucosa para la obtención de energía la cual es abundante en los fluidos del huésped. Mientras que en el insecto vector obtienen su energía a partir de la L-prolina, D-prolina, L-histidina y/o la L-glutamina, los cuales se encuentran en gran proporción dentro del insecto hematófago. De igual manera, la fuente de carbono usada en el estadio intracelular de amastigote al residir en el citoplasma de la célula huésped son azúcares fosforilados por lo que tienen un metabolismo energético basado en glucosa (Bringaud *et al*, 2006). Por otro lado, algunos estadios durante el desarrollo de los tripanosomátidos han sido perfectamente adaptados a las condiciones de cultivo *in vitro*. Éstos se pueden mantener en medios ricos en glucosa y aminoácidos los cuales son utilizados por el parásito como fuentes de carbono para la producción de ATP; bajo estas condiciones de crecimiento, las fuentes de carbono se convierten en productos parcialmente oxidados. Sorpresivamente algunas especies como *T. cruzi* y *T. brucei* prefieren consumir glucosa como fuente de carbono en vez de aminoácidos a pesar de que su hábitat natural sea rico en L-prolina (Bringaud *et al.*, 2006). La producción de ATP es también esencial para la movilidad del flagelo, este organelo es también indispensable en funciones adicionales como organelo sensorial, de adhesión, así como en la morfogénesis y división celular (Lacomble *et al.*, 2009).

Por lo anterior la glicólisis juega un papel crucial para la generación de ATP (Bakker *et al*, 2000). A pesar de estar presentes todas las enzimas del ciclo de Krebs, éste se utiliza parcialmente y en sentido inverso (Duschak y Cazzulo, 1991). El conjunto de reacciones de esta ruta glicolítica se muestran en la figura 8. En *T. cruzi*, las siete primeras enzimas de esta vía están localizadas en el glicosoma, organelo tipo peroxisoma formado por una sola membrana cuya medida es de 0.2- 2.8 μ m de diámetro (Cymeryng *et al.*, 1995). En este organelo se realiza la conversión de glucosa hasta 3-fosfoglicerato, mientras que las tres reacciones restantes de ésta vía residen en el citosol. El metabolismo anaeróbico de los carbohidratos requiere de un balance de la coenzima NAD⁺ la cual actúa como agente oxidante (en la ausencia

de oxígeno), sin embargo, la cantidad de NAD^+ en cualquier célula es limitado, por lo tanto el metabolismo se detendrá tan pronto como todo el NAD^+ sea reducido a $\text{NADH} + \text{H}^+$. Sin embargo, existe un mecanismo para la reoxidación del nucleótido de nicotinamida reducido. En la glicólisis, esta reoxidación ocurre cuando el piruvato se reduce a lactato. El NAD^+ sirve como transportador de electrones en ausencia de oxígeno. (Nelson y Cox, 2005)

En consecuencia, el paso determinante para que la glicólisis pueda continuar de manera ininterrumpida es la regeneración de NAD^+ el cual es utilizado como cofactor por la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, enzima involucrada en la conversión del gliceraldehido-3-fosfafo en 1,3- bisfosfoglicerato. Así, el reciclaje de este cofactor oxidado se logra mediante la acción de la enzima lactato deshidrogenasa que convierte el piruvato, en lactato (Figura 8).

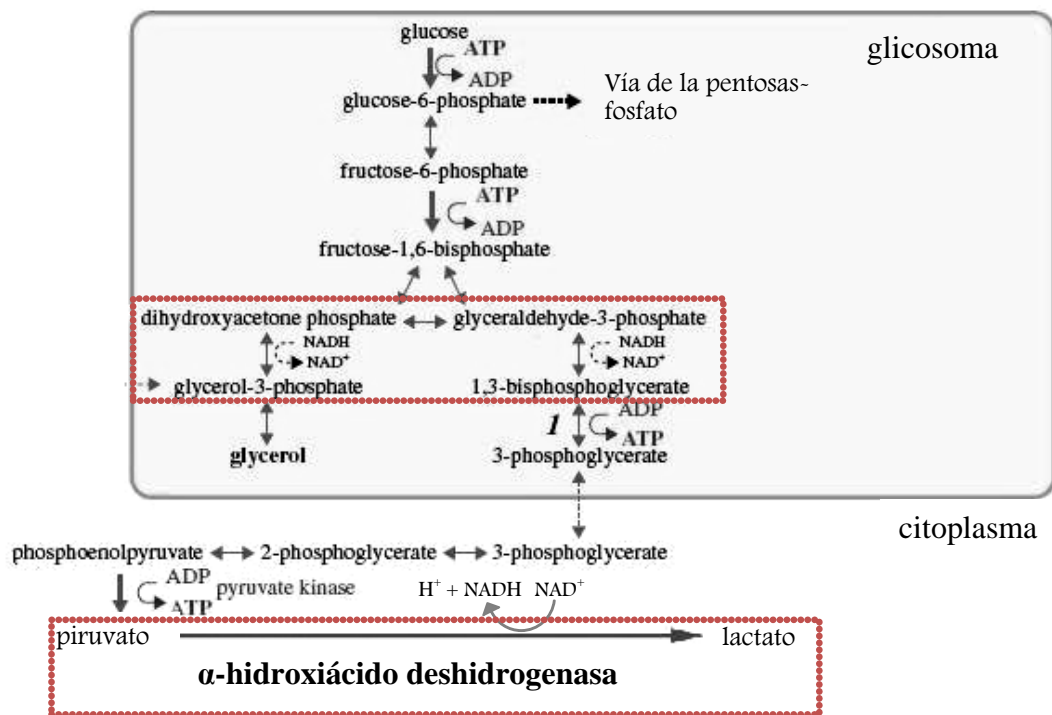


Figura 8. Ruta glicolítica de *Trypanosoma cruzi*. Las primeras 7 reacciones de esta ruta se llevan a cabo en el glicosoma y las tres restantes se llevan a cabo en el citoplasma. Dentro del recuadro rojo se muestran las reacciones en las que está involucrada la reoxidación del NADH, dentro de la cual participa la α -hidroxiácido deshidrogenasa (modificado de Ginger, 2006).

La mayoría de los tripanosomátidos producen lactato a partir de glucosa (Bringaud *et al.*, 2006). En mamíferos quien lleva a cabo la conversión de lactato a partir de piruvato es la LDH, pero en *T. cruzi*, quien se encarga de esta reacción con la consecuente reoxidación del NADH es la α -hidroxiácido deshidrogenasa (Coronel *et al.*, 1981).

1.5.3. Alfa-hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II

T. cruzi posee un análogo de la lactato deshidrogenasa de humanos que puede utilizar como sustrato además del piruvato otro tipo de α -cetoácidos, es por esta razón que se le ha denominado como **α -hidroxiácido deshidrogenasa (α -HADH)**. Esta enzima presenta dos isoenzimas; la tipo I que utiliza como sustrato el piruvato y butirato, y la tipo II que utiliza como sustratos a una gran cantidad de α -cetoácidos. (Coronel *et al.*, 1981)

A continuación se muestra (Figura 9) una representación estructural de los aminoácidos involucrados en la unión al sustrato así como el sitio de unión al cofactor NAD⁺ para una enzima similar a la α -HADH de *T. cruzi*, que utiliza α -cetoácidos como sustratos.

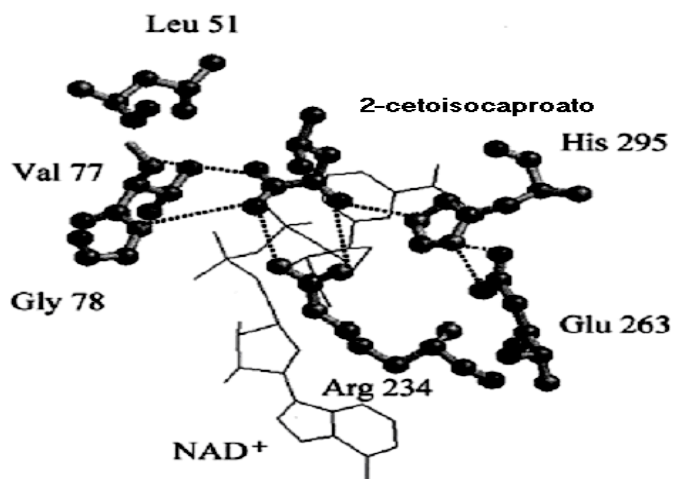


Figura 9. Sitio de unión al sustrato de la α -HADH. En la figura se señalan los aminoácidos involucrados en la unión al sustrato (2-cetoisocaproato) y los aminoácidos que participan en la catálisis enzimática (modificado de Chizuka *et al.*, 2003).

La α -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II, puede localizarse tanto en el citoplasma como en la mitocondria lo que permite que los α -cetoácidos producidos por la transaminación de algunos aminoácidos como la isoleucina, puedan ser

reducidos por el NADH utilizando su versión citoplasmática. Los α -hidroxiácidos formados penetran en la mitocondria y se reoxidan por la α -hidroxiácido deshidrogenasa mitocondrial transfiriendo los electrones al NAD^+ y de aquí a la cadena respiratoria. Este mecanismo actúa como una lanzadera donde se pueden reoxidar en la mitocondria equivalentes reductores (NADH) generados en el citoplasma como se muestra en la figura 10 (Montamat *et al.*, 1987).

Por otro lado, el metabolismo que presenta *Trypanosoma cruzi* en algunos estadios durante su ciclo de vida está basado en el consumo y la transformación de aminoácidos. Es por esto que, las enzimas que están relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos podría poner de manifiesto blancos terapéuticos y fortalecer el desarrollo de nuevos fármacos (Guimarães *et al.*, 2008).

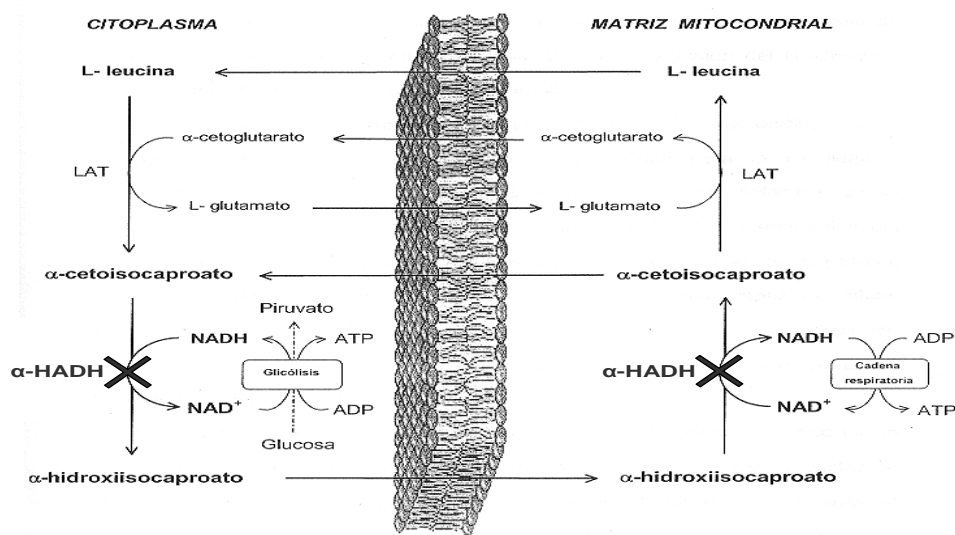


Figura 10. Esquema de la lanzadera en la que interviene la α -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II (α -HADH) de *Trypanosoma cruzi* (Gerez de Burgos *et al.*, 1978). X Indica el sitio de la inhibición de la α -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II de *T. cruzi* (α -HADH). Proponemos entonces que la inhibición de esta enzima conducirá a una inhibición en el metabolismo energético de *T. cruzi*

Debido a que la glicólisis se considera como una ruta bioquímica blanco para el diseño de nuevos agentes tripanomicidas (Verlinde *et al.*, 2001), el objetivo principal de este trabajo es diseñar inhibidores de la α -HADH que bloqueen tanto la glicólisis (evitando la reoxidación del NADH) y el mecanismo de lanzadera descrito. Es decir, que estaríamos empleando esta enzima como un blanco bioquímico muy prometedor para el diseño de nuevos fármacos con actividad tripanomicida.

Algunos de los α -hidroxiácidos que tienen gran afinidad y las reacciones que cataliza la α -HADH se muestra en la figura 11.

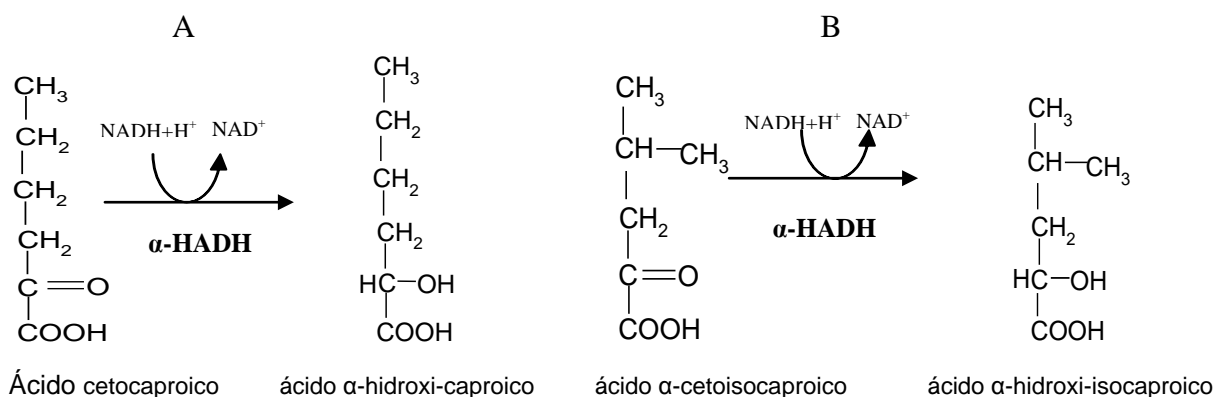
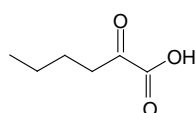


Figura 11. Reacciones catalizadas por la α -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II de *Trypanosoma cruzi*. Esta oxido-reductasa presenta alta afinidad por los ácidos α -cetocaproico (A) y α -ceto isocaproico (B), produciendo el α -hidroxiácido correspondiente, utilizando NADH como cofactor.

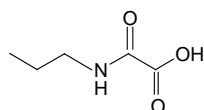
1.6 Antecedentes

En la búsqueda de compuestos análogos a estos sustratos que funcionen como inhibidores de la α -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II, se han diseñado y sintetizado derivados del ácido oxámico (Chena *et al.*, 2005) como el ácido N-propil oxámico y el ácido N-isopropil oxámico, basado en que son análogos estructurales de los sustratos con mayor afinidad por esta enzima, el ácido α -cetocaproico y el ácido α -cetoisocaproico. Éstos resultaron ser excelentes inhibidores selectivos y competitivos de la α -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II en ensayos enzimáticos (Chena *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando se probaron estos oxamatos N-sustituidos tanto *in vitro* en cultivos de *T. cruzi*, como *in vivo* sobre la parasitemia en animales de laboratorio, no resultaron tener actividad tripanomicida, a pesar de presentar un buen efecto inhibidor de la α -HADH isoenzima II de *T. cruzi* en tanto que Nifurtimox y Benznidazol si presentan efecto tripanomicida (debido a que éstas sustancias son poco polares). Se consideró entonces que debido a la polaridad de los oxamatos N-sustituidos, éstos son incapaces de atravesar las membranas celulares para inhibir la enzima. Por esta razón se optó por la síntesis de los ésteres etílicos, de menor polaridad que pudieran atravesar las membranas celulares y una

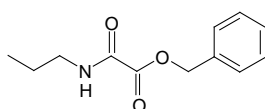
vez dentro del tripanosoma ser hidrolizados por las carboxi-esterasas intracelulares que ya se han reportado para *T. cruzi* y liberar los oxamatos N-sustituidos con actividad biológica (Aguirre *et al.*, 2007). En la figura 12 se muestra la similitud estructural entre el ácido α -cetocaproico, el ácido N-propil oxámico y los ésteres derivados de este ácido.



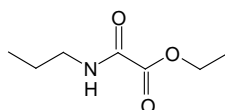
Ácido α -cetocaproico



Ácido N-propil oxámico



éster bencílico del NPOx



éster etílico del NPOx

Figura 12. Estructuras químicas del ácido -cetocaproico y sus análogos estructurales. El ácido N-propil oxámico (NPOx) se sintetizó como un análogo estructural del ácido α -cetocaproico. Y los ésteres bencílico y etílico del NPOx se sintetizaron para disminuir la polaridad de este ácido.

Se propuso entonces que tanto el NPOx-Et como el NPOx-B estarían actuando como profármacos, éstos se definen como agentes que son inactivos por si mismos pero que se transforman a moléculas o metabolitos activos farmacológicamente. El propósito del diseño de un profármaco es superar las barreras biológicas para tener un efecto accesible a la célula blanco. Basado en ésta y otras consideraciones el principal objetivo del diseño de profármacos es mejorar la formulación mejorando aspectos como: la solubilidad, estabilidad química, biodisponibilidad y selectividad a la célula blanco para prolongar la duración y acción farmacológica y disminuir los efectos adversos. Este tipo de estrategias se utiliza para fármacos que presentan excelentes actividades farmacológicas pero presentan algunos inconvenientes fisicoquímicos y farmacocinéticos para llevar a cabo su actividad. (Testa y Mayer, 2003)

Debido a lo anterior, en el caso del éster bencílico del ácido N-propil oxámico (NPOx-B), el mecanismo que se propone para que este ejerza el efecto tripanomicida se esquematiza en la figura 13. El NPOx-B al ser una sustancia más hidrofóbica podría atravesar las membranas celulares con mayor facilidad que los ésteres etílicos y una vez dentro ser hidrolizado por las carboxi-esterasas presentes

en *T. cruzi*, como producto de la hidrólisis se obtendrían el N-propil oxamato y el alcohol bencílico.

Trabajos previos, en donde se comparó la actividad tripanomicida del NPOx-Et con NPOx-B con el fin de observar el efecto que produce la presencia de diferentes sustituyentes que confieran diferente polaridad, mostraron que el NPOx-B resultó ser más efectivo que el NPOx-Et sobre epimastigotes (Aguirre, 2006; Tellez, 2007) y sobre tripomastigotes sanguíneos en, al menos dos cepas de *T. cruzi*. Es por eso que el propósito de este trabajo es determinar el efecto comparativo de ambos ésteres sobre la formación de nidos de amastigotes y sobre la parasitemia *in vivo* en el modelo murino y determinar el efecto que tienen estos compuestos de manera directa sobre el metabolismo energético de *T. cruzi*. Por otro lado, tratar de explicar si el incremento del efecto tripanomicida *in vitro* del NPOx-Et con respecto al NPOx-B se debe a que en la hidrólisis intracelular de éste último se produce *in situ* el alcohol bencílico el cual probablemente contribuya al efecto tripanomicida ya que esta sustancia presenta propiedades antimicrobianas (Rabenberg *et al.*, 2002). De tal forma que el NPOx-B estaría actuando a su vez como un acarreador de este agente antibacteriano comúnmente utilizado, en soluciones intravenosas como preservativo.

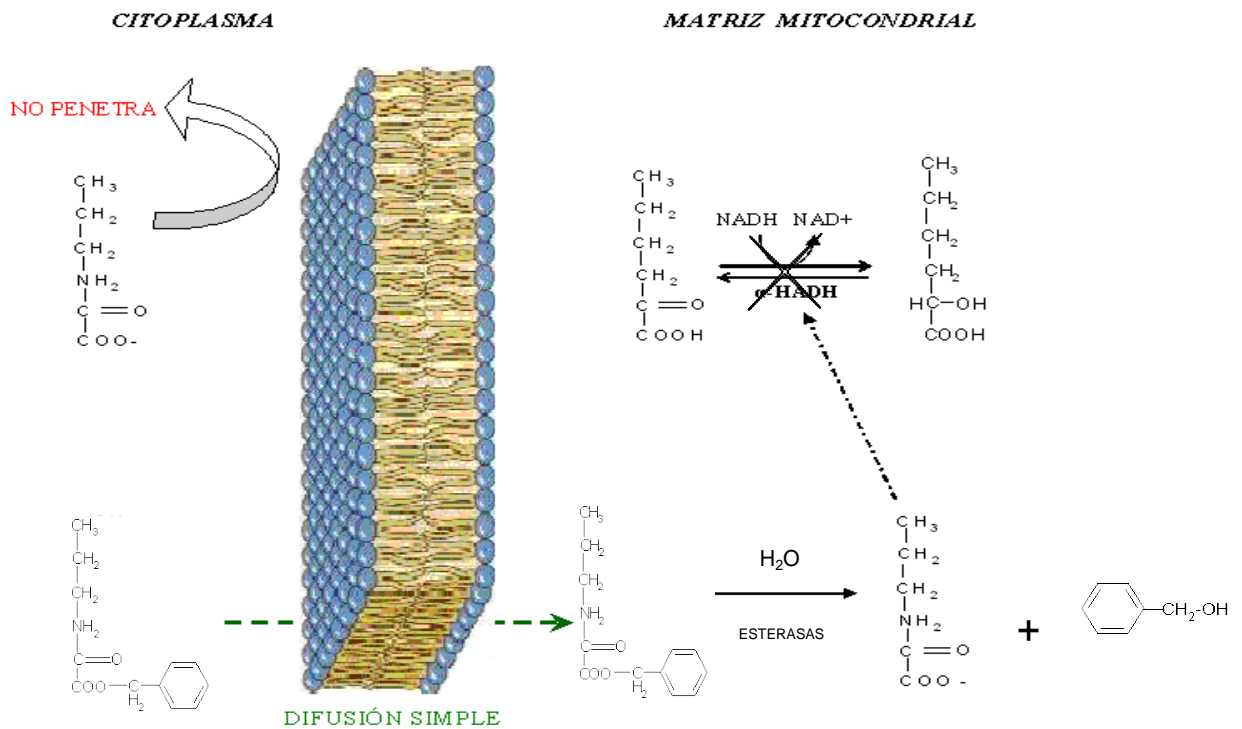


Figura 13. Mecanismo propuesto para el efecto tripanomicida del éster bencílico del ácido N-propil oxámico. Éste actúa como un profármaco inhibidor de la α -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II de *T. cruzi* (α -HADH): alfa hidroxiácido deshidrogenasa. De la hidrólisis de este compuesto por las esterasas se produce el alcohol bencílico (Aguirre, 2006).

1.7. JUSTIFICACIÓN

La ausencia de un tratamiento efectivo contra la enfermedad de Chagas hace de gran interés desarrollar nuevos agentes tripanomicidas. Varios derivados del ácido oxámico han mostrado actividad tripanomicida *in vitro* e *in vivo*. Por lo que en este trabajo se estudiará el efecto tripanomicida del NPOx-B comparándolo con el NPOx-Et, dos ésteres del NPOx como posibles agentes tripanomicidas para el tratamiento tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Así como estudiar si la presencia del alcohol bencílico incrementará el efecto tripanomicida del NPOx.

1.8. HIPÓTESIS

Al incrementar la hidrofobicidad del NPOx a través de la sustitución del grupo etilo en la molécula del NPOx-Et, por un bencilo (NPOx-B), se favorecerá el paso a través de las membranas tanto del parásito como de la célula huésped. Asimismo la formación *in situ* del alcohol bencílico producto de la hidrólisis del NPOx-B, se espera incrementar tanto la inhibición del metabolismo energético, como el efecto tripanomicida del NPOx-B en comparación con el NPOx-Et.

1.9 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar el efecto tripanomicida sobre los estadios extracelulares e intracelulares de las cepas NINOA e INC-5 de *Trypanosoma cruzi*, así como el efecto sobre metabolismo energético del éster etílico en comparación con el éster bencílico del ácido N-propil oxámico en la cepas NINOA e INC-5 de *T. cruzi*.

1.9.2 Objetivos particulares

Corroborar si efectivamente el alcohol bencílico presenta actividad tripanomicida sobre cultivos de epimastigotes de la cepa NINOA e INC-5

- i. Cuantificar espectrofotométricamente el NPOx-B en sobrenadantes de cultivos de epimastigotes tratados con este compuesto con respecto al tiempo.

- ii. Estudiar el efecto comparativo de los dos ésteres sobre el metabolismo energético de *T. cruzi*, mediante la medición de los niveles de ATP y NAD⁺ totales en epimastigotes de la cepas NINOA e INC-5.
- iii. Estudiar el efecto comparativo de ambos ésteres sobre la parasitemia de ratones infectados con la cepa NINOA e INC-5, tras la administración a corto y a largo plazo y compararlo con el efecto producido por Nifurtimox y Benznidazol.
- iv. Observar comparativamente la posible disminución de nidos amastigotes en músculo esquelético y músculo cardíaco tras la administración a largo plazo de ambos ésteres y de los fármaco Benznidazol y Nifurtimox.
- v. Determinar la citotoxicidad *in vitro* del NPOx-Et y NPOx-B en cultivos celulares
- vi. Determinar la toxicidad oral aguda del NPOx-Et y NPOx-B.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Compuestos químicos a evaluar.

Éster etílico del ácido N-propil oxámico y éster bencílico del ácido N-propil oxámico sintetizados en el laboratorio de enzimología Depto. Bioquímica de ENCB-IPN.

Lampit® (Nifurtimox) BAYER. Lote 477580. Comprimidos de 120 mg.

Rochagan® (Benznidazol) ROCHE. Lote 110878. Comprimidos 100 mg.

2.2 Material biológico

a) *T. cruzi* cepa INC-5. Fue aislada en el año de 1997 a partir de una paciente de 58 años de edad, con cuadro crónico de la enfermedad. La paciente era procedente de la localidad Congregación del estado de Guanajuato, México.

b) *T. cruzi* cepa NINOA. Fue aislada en el año de 1986 a partir de una paciente de 8 años de edad, con cuadro agudo de la enfermedad. La paciente era procedente del

estado de Oaxaca. Estas cepas han sido conservadas en el departamento de Parasitología de la ENCB-IPN.

Es importante mencionar que la metodología que se describe a continuación será la misma que se realizará para las dos cepas de *T. cruzi* que se emplearán en este estudio (NINOA e INC-5).

Para los estudios de metabolismo energético los epimastigotes se cultivaron en medio bifásico agar sangre/ BHI (infusión de cerebro y corazón) suplementado con antibióticos (penicilina 100 UI/mL y estreptomina 100 µg/mL). Para las determinaciones de ATP y NAD⁺ total se utilizaron cultivos en la fase exponencial de crecimiento.

Para los estudios *in vivo*, se inocularon por vía intraperitoneal ratones (hembras) de 18-20 g de peso de la cepa CD-1 con 1×10^5 tripomastigotes de las cepas NINOA e INC-5.

Para la determinación de la citotoxicidad se mantuvieron cultivos de células Vero en medio MEM suplementado con HEPES 10 mM, pH 7.4, suero bovino fetal 10%, L-glutamina 2 mM, Na₂CO₃ 0.02% y antibióticos (penicilina 500 UI/mL y estreptomina 500 µg/mL), a 37°C y 5% de CO₂.

2.3 Determinación de la permeabilidad del NPOx-B a la membrana de los epimastigotes de *T. cruzi*.

Para determinar si el NPOx-B es efectivamente capaz de atravesar la membrana plasmática de epimastigotes de *T. cruzi* se realizó el espectro de absorbancia de UV de 200nm - 300 nm del NPOx-B basados en la capacidad que tienen las dobles ligaduras conjugadas de los anillos aromáticos para absorber luz del rango del UV. Para eliminar la absorbancia debida al DMSO (disolvente) y al medio en el que se encuentran los epimastigotes (BHI), se realizó también el espectro de absorbancia del DMSO, ambos en medio BHI y así poder extrapolar los espectros obtenidos a las condiciones experimentales de cultivos de epimastigotes.

Una vez obtenido la longitud de onda máxima (λ_{max}) a la que absorbe el NPOx-B y no el DMSO se procedió a realizar una curva tipo de NPOx-B por duplicado en un rango de concentraciones de 0.25mM-4mM.

Posteriormente, se trataron los epimastigotes con este compuesto para determinar la absorbancia del sobrenadante de los cultivos de epimastigotes a diferentes tiempos. Para el tratamiento de los epimastigotes con NPOx-B se cosecharon cultivos de epimastigotes en fase exponencial de crecimiento por centrifugación a 3000g durante 5 min. El paquete celular se resuspendió en medio BHI para obtener una suspensión de 2×10^6 epimastigotes/mL. Los epimastigotes fueron expuestos por separado a una concentración de 1mM de NPOx-B durante los siguientes tiempos: 0, 15, 30, 45 y 60 min. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 3000 g durante 5 min y se leyó el sobrenadante en un espectrofotómetro de UV. La disminución en la absorbancia con en los sobrenadantes fue un indicativo de la incorporación del NPOx-B al interior de los epimastigotes de *T. cruzi*.

Para determinar el grado de incorporación del compuesto al interior de los epimastigotes se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos a cada tiempo en la curva tipo de NPOx-B y se calcularon los porcentajes de NPOx-B incorporado tomando como 100% el tiempo cero.

2.4 Estudio *in vitro* del alcohol bencílico sobre la viabilidad de epimastigotes en cultivo.

Para monitorear la viabilidad *in vitro* de epimastigotes se cosecharon por centrifugación a 3000g durante 5 min. El paquete celular se resuspendió en medio BHI suplementado para obtener una suspensión de 2×10^6 epimastigotes/mL. Los epimastigotes fueron expuestos por separado a los siguientes compuestos: alcohol bencílico en un rango de concentraciones de 0.25 - 8 mM utilizando un control negativo de DMSO 2.5% durante 60 min a temperatura ambiente. La viabilidad se monitoreó por medio de una tinción con diacetato de fluoresceína (DAF) y yoduro de propidio (PI). La solución patrón de DAF se preparó al disolver 5 mg/mL de acetona. El DAF es un éster no polar que pasa a través de las membranas celulares y es hidrolizado por esterasas intracelulares produciendo fluorescencia. La fluoresceína

es un compuesto polar que se acumula dentro de las células, al pasar muy lentamente a través de la membrana de las células vivas y exhibe una fluorescencia verde cuando es excitada por luz azul. Por otro lado, el PI se intercala en los ácidos nucleicos para formar un complejo fluorescente rojo brillante (Jones y Senft, 1985). La membrana no es permeable a este compuesto, por lo que el PI solo puede atravesarla cuando ésta ha perdido su permeabilidad, es decir cuando la célula ya no es viable. Así, los epimastigotes viables se observaron verdes y los muertos o no viables, rojos.

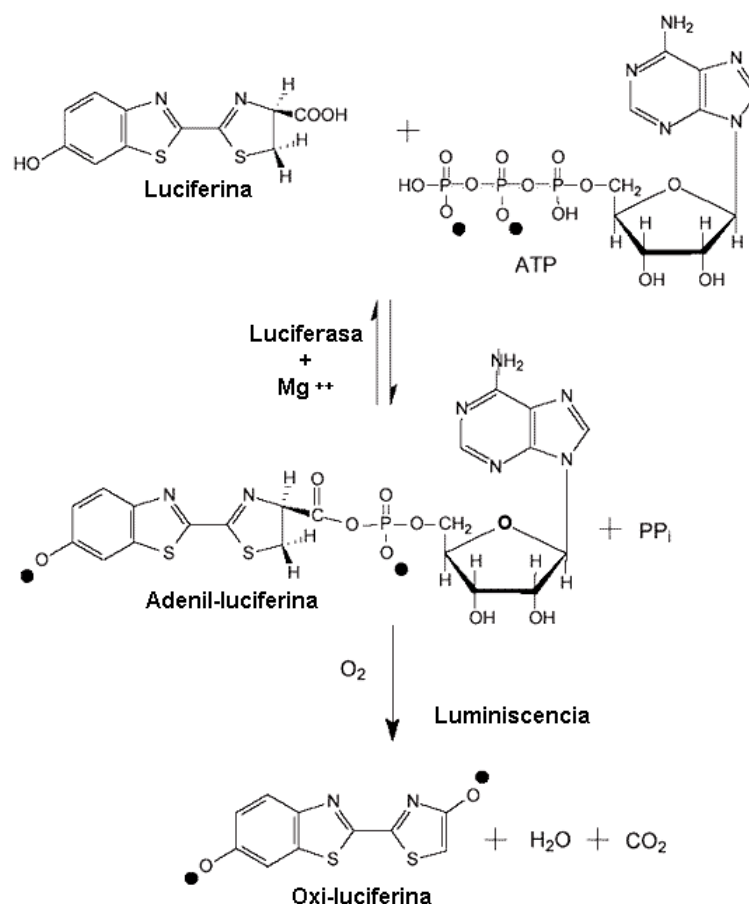
La solución de trabajo de DAF se preparó en fresco al adicionar 0.04 mL de la solución patrón en medio de cultivo BHI suplementado. Un miligramo de PI se disolvió en 50 mL de BHI suplementado. Para teñir los epimastigotes, se adicionaron 0.1 mL de la solución de trabajo de DAF (2 μ g) y 0.03 mL (0.6 μ g) de PI directamente a la suspensión de epimastigotes. Las células fueron teñidas por 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente se tomó una alícuota de 5 μ l y se colocó en un portaobjetos y cubreobjetos limpios, para ser observado en el microscopio equipado con epi-fluorescencia, con lámpara de halógeno de 100 W y filtro de excitación de 450-490 nm (azul). Este filtro permitió que los epimastigotes con fluorescencia verde y roja pudieran ser vistos simultáneamente. Se contó el número de epimastigotes viables y no viables en 25 campos, con una aumento de 40X para determinar el número de epimastigotes viables por mL y obtener el porcentaje de viabilidad. Tomando como 100% el control de DMSO. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y la prueba post-ANOVA para comparaciones múltiples de Dunnett, utilizando un nivel de significancia (α) de 0.05.

2.5 Efecto del NPOx-Et y NPOx-B sobre el metabolismo energético de *T. cruzi*.

La determinación del efecto de los ésteres del etílico y bencílico sobre el metabolismo energético de *T. cruzi* se realizó la cuantificación del ATP y NAD⁺ total.

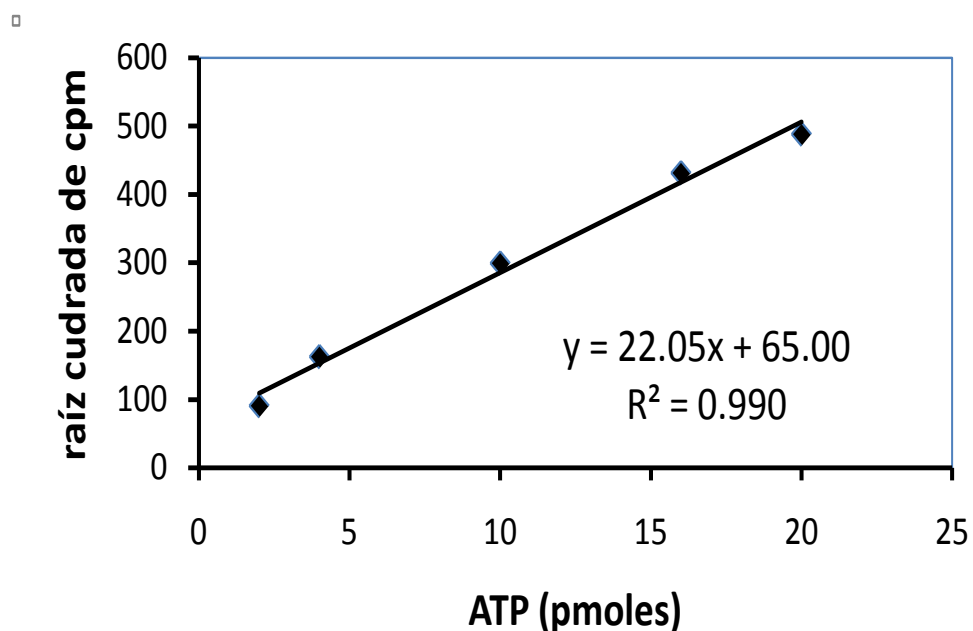
2.5.1 Medición de los cantidad intracelular de ATP total en epimastigotes de *T. cruzi*.

Se midieron los niveles de ATP en ausencia y presencia del NPOx-Et y NPOx-B en las concentraciones de 2, 4 y 8 mM para cada compuesto, después de incubarlos 60 min con epimastigotes en cultivo de las cepas NINOA e INC-5. Para este ensayo se utilizó un juego de reactivos que contiene todas las sustancias necesarias para realizar este experimento (Sigma, ATP bioluminescent somatic cell assay kit, FL-ASC). La determinación se llevó a cabo mediante el uso de un contador de centelleo líquido Beckman L6500, para medir la quimioluminiscencia producida por la reacción de la luciferasa dependiente de ATP cuya reacción se muestra a continuación.



Las muestras fueron leídas durante 1 minuto en un rango abierto de lectura de cuentas por minuto (cpm). Una suspensión de epimastigotes, a una concentración de 1×10^7 epimastigotes/mL se incubaron durante 60 min con los compuestos (NPOx-Et, NPOx-B, DMSO 2.5% como control) a una temperatura ambiente. Al término del tiempo se colocaron 25 μ L de la muestra celular en un tubo cónico y se

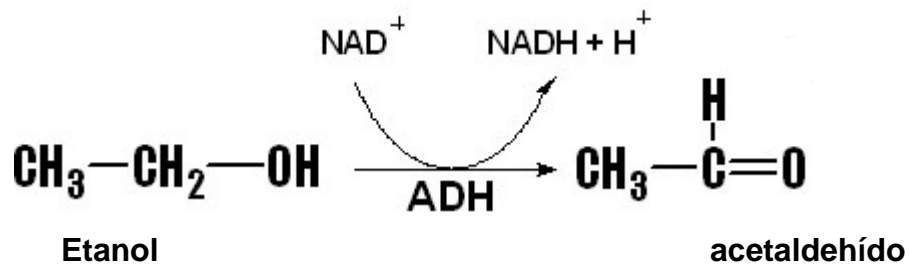
calentaron por 3 min en un baño de agua hirviendo para inactivar las fosfatasas endógenas e inmediatamente se trasladaron a un baño de hielo. Después se adicionaron 50 μL del reactivo de lisis y se dejaron reposar en hielo por 5 min, más tarde se adicionaron 100 μL de la mezcla de ensayo fría que contendrá luciferina, la enzima luciferasa, EDTA y MgSO_4 . Los tubos se dejaron reposar por 5 min a temperatura ambiente para después ser colocados en viales apropiados para medir la intensidad de la quimioluminiscencia en el contador de centelleo líquido (Luque *et al.*, 2003). Para la cuantificación de ATP se realizó previamente por duplicado una curva tipo con 2, 4, 10, 20 y 40 pmol de ATP (Gráfica 1) para determinar la cantidad de ATP para cada tratamiento en picomoles. Posteriormente los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente en porcentajes (tomando como 100% al control) mediante un ANOVA de una vía utilizando la post-prueba de comparaciones múltiples de Dunnett que nos permite hacer comparaciones estadísticas de los grupos contra un grupo control, utilizando un intervalo de confianza del 95%.



Gráfica 1. Curva tipo de ATP. Las cuentas por minuto (cpm) se determinaron mediante la acción de la luciferasa durante 5min por el método de Luque *et al.*, 2003.

2.5.2 Determinación de la concentración intracelular de NAD⁺ en epimastigotes de *T. cruzi*.

La determinación del Nicotinamida adenin-dinucleótido oxidado (NAD⁺) total se realizó espectrofotométricamente utilizando un método enzimático que se basa en la siguiente reacción:



[ADH: alcohol deshidrogenasa]

A pH 7, el equilibrio de la reacción se encuentra favorecido hacia la derecha, lo que garantiza la completa reducción del NAD⁺ incluso con concentraciones muy bajas de sustrato.

Los epimastigotes se trataron de la misma manera que para la determinación de ATP hasta transcurridos los 60 min de incubación. Posteriormente, a cada tubo se le dio el siguiente tratamiento: se adicionaron 0.8 mL de HClO₄, 0.6 M frío y se agitó vigorosamente en un baño de hielo. Posteriormente se centrifugó a 5000 g por 5 min, se separó 1 mL del sobrenadante, se colocó en un baño de hielo y se neutralizó con 0.2 mL de una solución K₂HPO₄ 1M y se ajustó el pH con KOH 3 M hasta de 7.2 - 7.4 agitando vigorosamente y permaneciendo en el baño de hielo. Posteriormente se dejó reposar para separar el precipitado formado y se separó el sobrenadante para la determinación del contenido de NAD⁺. La mezcla de reacción se preparó adicionando 1 mL de sobrenadante, 1 mL de regulador de pirofosfato/semicarbazida (Na₄P₂O₇ · 10 H₂O 0.1 M/ semicarbazida 45 mM, pH 8.8) y 0.01 mL de etanol 99.8% v/v. Se mezcló y se leyó la absorbancia (A₁) a 340 nm a los 10-15 min hasta que el valor de la absorbancia permanezca constante. Posteriormente se adicionaron 0.01 mL de la suspensión e ADH (300 kUI/L), se agitó y se leyó la absorbancia (A₂) después de transcurridos 6 min o hasta que el valor de la absorbancia permaneció constante. Para el cálculo de la concentración de NAD⁺ en μmol/L se multiplicó el

valor de ΔA por un factor (321) que toma en cuenta el coeficiente de absorptividad molar del NADH a 340 nm (Klingenberg, 1989). Posteriormente los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente en porcentajes (tomando como 100% al control) mediante un ANOVA de una vía utilizando la post-prueba de comparaciones múltiples de Dunnett que nos permite hacer comparaciones estadísticas de los grupos contra un grupo control, utilizando un intervalo de confianza del 95%.

2.6 Determinación de la toxicidad del NPOx-Et y NPOx-B *in vitro* sobre la viabilidad de cultivos celulares.

Utilizando cajas de cultivo de 24 pozos se sembraron monocapas de células Vero que contenían aproximadamente 2×10^5 células por pozo en medio MEM. Se dejaron adherir a la caja durante 24 h y posteriormente se les cambió el medio por medio suplementado con NPOx-Et ó el NPOx-B a una concentración final de 0.15, 0.3, 0.6, 1.25 y 2.5 mM, así como, un control de células tratadas con DMSO al 2% y un testigo sin tratamiento, cada concentración de los compuestos se probó por duplicado. Se realizó un cambio de medio a las 48 h con medio igualmente suplementado con cada una de las concentraciones de los compuestos y transcurridas 72 h se determinó la viabilidad celular utilizando azul tripano como colorante de exclusión.

2.7 Determinación de la toxicidad oral aguda del NPOx-Et y NPOx-B.

Se utilizaron lotes de tres ratones por dosis de la cepa CD-1 de 8 a 12 semanas de edad con $\pm 20\%$ (entre 18- 25g) del promedio del peso. Los ratones se dejaron en ayuno 1-2 horas antes de la administración de una sola dosis de NPOx-Et ó NPOx-B utilizando como vehículo aceite de maíz. Se administró utilizando una cánula de acero inoxidable, una sola dosis oral, en un volumen no mayor a los 0.3 mL dependiendo el peso del ratón. Se tomó como dosis de partida 1.5 g/kg de peso.

Después de la administración se les regresó el alimento a los animales y se mantuvieron en observación durante 72 h. A las dosis en las que se presentaron 1 ó más muertes, los lotes se hicieron de seis ratones. Se determinó el porcentaje de mortalidad de cada lote (OECD, 2001). Posteriormente se gráfico el porcentaje de mortalidad contra la dosis. Para interpolar y obtener el dato de dosis letal al 50 por ciento (LD₅₀) se realizó la gráfica de unidades probits contra la dosis (Klassen, 2001).

2.8 Efecto tripanomicida de los ésteres etílico y bencílico del ácido N-propil oxámico *in vivo*.

Los ensayos *in vivo* que se realizaron son de dos tipos:

1. Administración de los compuestos a corto plazo: una sola dosis y b) a largo plazo: una dosis diariamente, durante 50 días.

2.8.1 Efecto tripanomicida del NPOx-Et y NPOx-B administrados a corto plazo, por el método de Filardi y Brener, 1984.

Este ensayo tiene como finalidad determinar el efecto de los compuestos sobre la parasitemia, para lo cual a lotes de 6 ratones cada uno, infectados en el máximo de parasitemia se les administró una sola dosis de los compuestos (NPOx-Et, NPOx-B, Nf, Bz y vehículo) de 500 mg/kg de peso por vía oral utilizando como vehículo aceite de maíz y se monitoreó la parasitemia conforme al método de Pizzi cada 2 horas durante 8 horas, tomando como control el tiempo cero (Zaragoza, 2005).

Método de Pizzi

1. Tomar 5 µL de sangre, mediante un corte en la vena caudal del ratón.
2. Depositar la sangre en un portaobjetos limpio, cuidando que no se extienda.
3. Colocar un cubreobjetos limpio y homogeneizar la muestra.
4. Contar los parásitos viables (móviles) en 25 campos al microscopio con un aumento de 40X.
5. Determinar el número de tripomastigotes/ mL.

2.8.2 Efecto tripanomicida del NPOx-Et y NPOx-B administrados a largo plazo.

Estos ensayos tienen la finalidad de observar el efecto de los compuestos sobre la parasitemia y el efecto sobre la formación de nidos de amastigotes, para lo cual a lotes de 6 ratones cada uno, que se encuentren en el tercer día post-infección se les administró una dosis diaria de los compuestos (NPOx-Et, NPOx-B, Nf, Bz y vehículo) de 100 mg/kg de peso durante 40 días por vía oral, utilizando como vehículo aceite de maíz. La administración de los fármacos comenzó tres días después de la inoculación. Se determinó la parasitemia cada tercer día por el método de Pizzi (Romanha *et al.*, 2010). Transcurridos los 40 días se sacrificaron los ratones para obtener el corazón y el músculo de la pierna izquierda y fueron fijados en formaldehído al 10% durante 5 días, haciendo cambios de formaldehído cada 48 h. Posteriormente, se realizó la siguiente metodología para la inclusión de los órganos en parafina, la cual fue igual para el músculo esquelético y el cardíaco. Inicialmente se realizó la deshidratación con etanol en concentraciones ascendentes (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%) deteniendo la fijación durante 30 min en cada porcentaje, seguido de con mezcla de etanol absoluto y xilol 1:2 durante 15 min. Por último los órganos fueron sometidos a aclaramiento con xilol durante el tiempo necesario para que estos estén transparentes (Zaragoza, 2005). Después se procedió a la inclusión en parafina con punto de fusión 58°C-60°C durante tres sesiones en la estufa, la primera de 24 h y las siguientes de 12 horas cada una, La inclusión definitiva en bloques metálicos se realizó con parafina de punto de fusión 56 - 58°C.

Una vez obtenidos los bloques se realizaron los cortes en un micrótopo de 8-9 µm de espesor y posteriormente se montaron en un portaobjetos, los cuales fueron sometidos a una desparafinación mediante dos cambios: 1) xilol, 2) carboxil-xilol criosota durante 10 min cada uno y un cambio de alcohol etílico absoluto - xilol por 10 min. Posteriormente, se realizó la hidratación con alcohol etílico 96%, alcohol etílico 70% y un cambio con agua por 10 min cada uno para posteriormente ser teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina. Ésta técnica consiste en teñir las laminillas con hematoxilina de Harris durante 8 min. Posteriormente se lavaron con

agua durante un minuto y se diferenciaron con alcohol ácido durante 15 s y se lavaron nuevamente con agua durante 1 min. Se viró el pH de las laminillas con agua amoniacal durante 15 s y se realizaron tres lavados con agua durante 1 min cada uno seguidos de la tinción con eosina durante 1 min. Las laminillas se deshidrataron con cambios de 10 s cada uno de alcohol de etílico 96% / alcohol etílico absoluto – xilol (1:1) / xilol. Las laminillas se mantuvieron en xilol y se realizaron tres cambios cada dos horas. Finalmente se montaron con un cubreobjetos de 24 X 50 mm con resina en xilol (Barbabosa *et al.*, 2009).

Una vez teñidas las laminillas se realizó la búsqueda y el conteo de nidos de amastigotes en por laminilla. Se seleccionaron tres laminillas al azar y se conto la misma area en cm^2 por tejido (Rodrigues *et al.*, 2010). Se obtuvo el promedio de nidos de amastigotes por laminilla (tres laminillas por tejido por tratamiento) y se compararon estadísticamente contra el control (vehículo) mediante un ANOVA de una vía utilizando la post-prueba de comparaciones múltiples de Dunnett que nos permite hacer comparaciones estadísticas de los grupos contra un grupo control, con un intervalo de confianza del 95%.

3. RESULTADOS

3.1 Determinación de la permeabilidad del NPOx-B a la membrana de los epimasgotes de *T. cruzi*.

Para determinar si efectivamente el NPOx-B estaba siendo incorporado al espacio intracelular de *T. cruzi*, es decir, si este compuesto es permeable a la membrana plasmática de este parásito se cuantificó la concentración de NPOx-B en el sobrenadante de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa NINOA a diferentes tiempos de tratamiento con este compuesto. Para la cuantificación del NPOx-B en el sobrenadante de los cultivos se buscó un método espectrofotométrico directo por lo que tuvo que obtenerse el espectro de absorción en el UV de este compuesto (Figura 14). Se obtuvo un pico de absorbancia a 248 nm para el NPOx-B mientras que a esta longitud de onda no existe pico para el DMSO por lo que se seleccionó esta longitud de onda para la determinación en el NPOx-B el sobrenadante de los cultivos. Para la cuantificación del NPOx-B a partir de la absorbancia se realizó una curva tipo de NPOx-B (Gráfica 2).

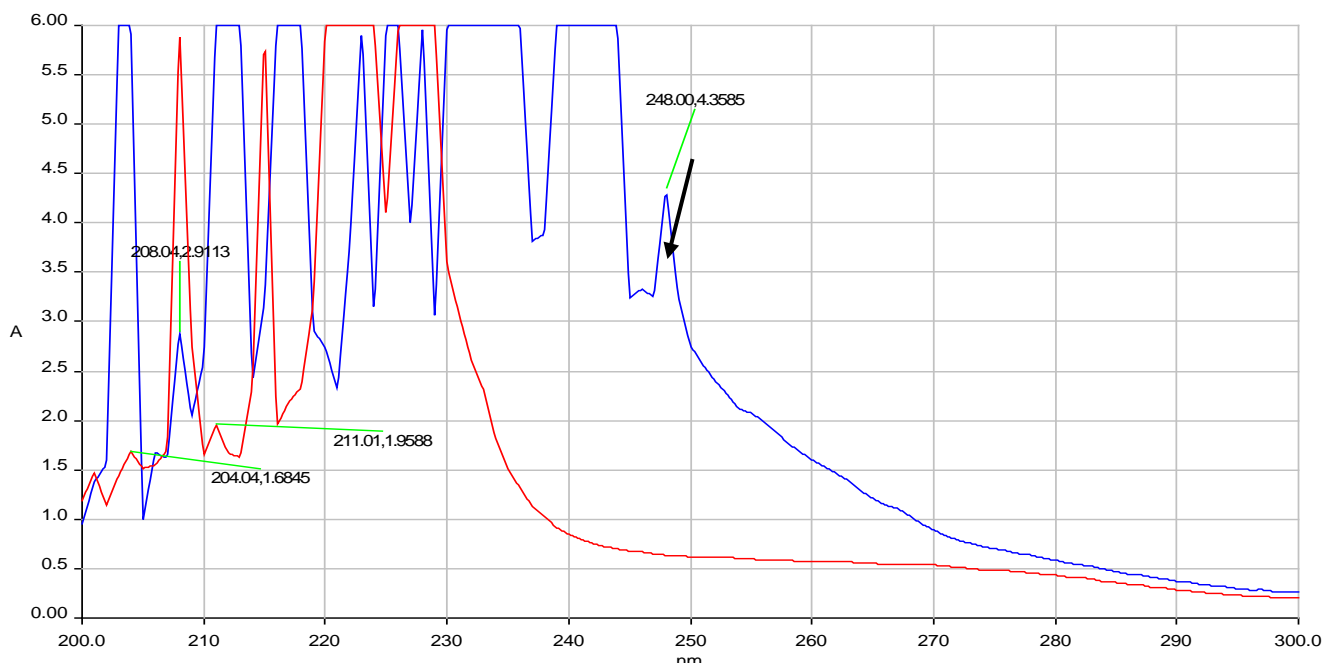
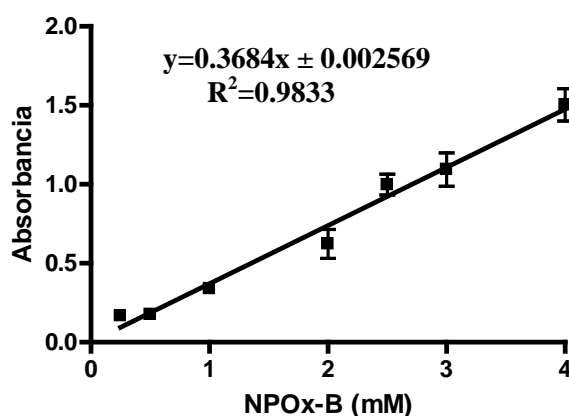
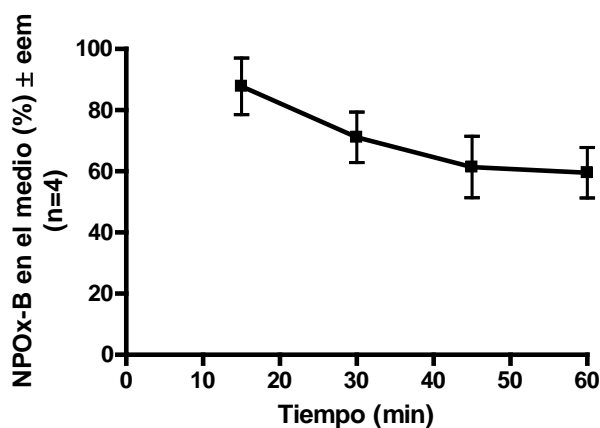


Figura 14. Espectro de absorción de UV del NPOx-B y DMSO. En color rojo se observa el espectro del DMSO y en azul el del NPOx-B donde se muestra con una flecha la longitud de onda elegida para la determinación de este compuesto. Ambos espectros se realizaron usando medio BHI como blanco.

Posteriormente se puso en contacto con el NPOx-B (1 mM) una suspensión de epimastigotes alicuotada para realizar la lectura de absorbancia del sobrenadante a diferentes tiempos. se utilizó como blanco el sobrenadante de una suspensión a la que le fue adicionado DMSO 2.5%. Se deteraron lecturas de absorbancia del sobrenadante a los 0 min, 15 min, 30 min., 45 min y 60 min obteniendo valores de concentración a partir de la absorbancia con ayuda de la curva tipo. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 3. Se observó una disminución en la concentración de NPOx-B en porcentajes calculados tomando como 100% al tiempo cero. Esta disminución fue proporcional al tiempo, siendo de 10% y 30% a los 15 min y 30 min respectivamente, mientras que para los 45 min y 60 min fue de 40%.



Gráfica 2. Curva tipo del NPOx-B. Las curva se realizó en medio BHI y como disolvente del NPOx-B se utilizó DMSO 2.5%. Las lecturas de absorbancia se determinaron a una longitud de onda de 248nm.

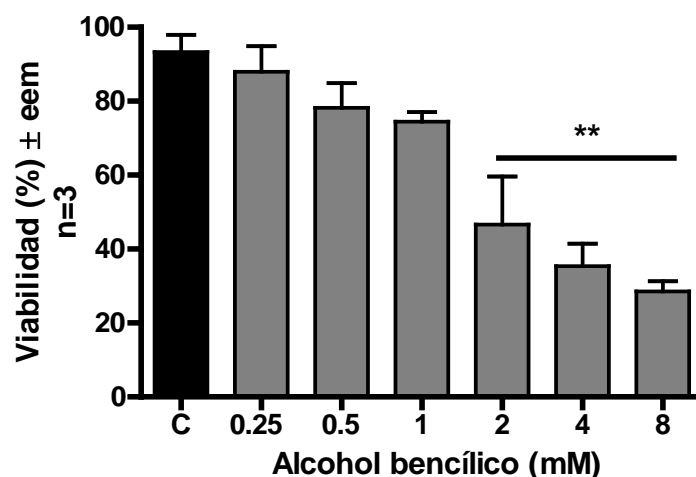


Gráfica 3. Determinación del NPOx-B en sobrenadantes, de cultivos de epimastigotes con respecto al tiempo. Suspensiones de epimastigotes (2×10^6 epimastigotes/mL) fueron tratados con el NPOx-B (1 mM) de 0 - 60 min a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo se determinó espectrofotométricamente la concentración del NPOx-B en el sobrenadante. Se tomó como 100% al tiempo cero que presentó una concentración promedio calculada de 0.93 mM.

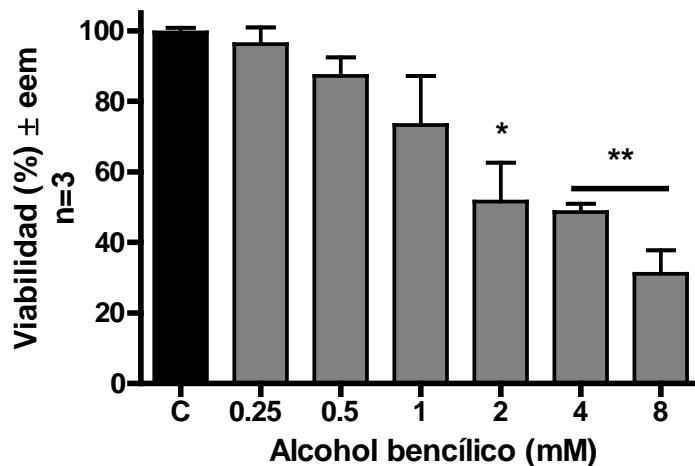
3.2 Estudio *in vitro* del alcohol bencílico sobre la viabilidad de epimastigotes en cultivo.

Para determinar si el alcohol bencílico presenta efecto tripanomicida se evaluó la actividad de este compuesto a diferentes concentraciones sobre la viabilidad de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa NINOA y de la cepa INC-5 utilizando la doble tinción de diacetato de fluoresceína (DAF)/ yoduro de propidio (PI) que permite observar a los epimastigotes viables de color verde y a los no viables de color rojo (Figura 15). Los resultados obtenidos en porcentajes se muestran en la gráficas 4 y 5 tomando como 100% al control negativo del DMSO al 2.5%. El efecto del alcohol bencílico sobre la disminución en la viabilidad fue proporcional a la concentración obteniéndose el mayor efecto a la concentración de aproximadamente 70% a la concentración de 8 mM en la cepa NINOA mientras que a la concentraciones de 2 mM y 4 mM fue aproximadamente de 50% y 60% respectivamente. A estas tres concentraciones la viabilidad de los epimastigotes fue estadísticamente diferente al control (Gráfica 4).

Un comportamiento similar se observó en la cepa INC-5 de *T. cruzi* en donde la viabilidad fue estadísticamente diferente al control a las tres concentraciones más altas evaluadas: 2, 4 y 8 mM en un 50%, 55% y 70% respectivamente (Gráfica 5).



Gráfica 4. Efecto del alcohol bencílico sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa NINOA de *T. cruzi*. Suspensiones de 2×10^6 epimastigotes/mL se incubaron en presencia del alcohol bencílico (0.25 – 8 mM) durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente se determinó la viabilidad celular por conteo al microscopio con la doble tinción de DAF/PI (Jones y Senft, 1985). Los porcentajes de viabilidad fueron obtenidos tomando como 100% al control de DMSO 2.5%. **** $P < 0.01$.**



Gráfica 5. Efecto del alcohol bencílico sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa INC-5 de *T. cruzi*. Suspensines de 2×10^6 epimastigotes/mL se incubaron en presencia del alcohol bencílico (0.25 – 8 mM) durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente se determinó la viabilidad celular por conteo al microscopio con la doble tinción de DAF/PI (Jones y Senft, 1985). Los porcentajes de viabilidad fueron obtenidos tomando como 100% al control de DMSO 2.5%. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

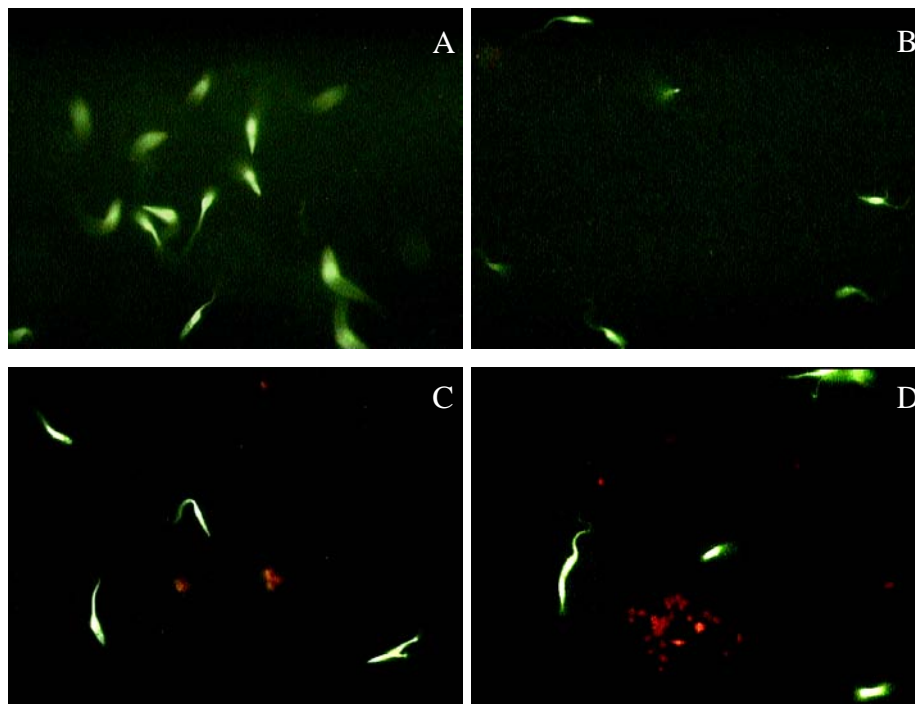
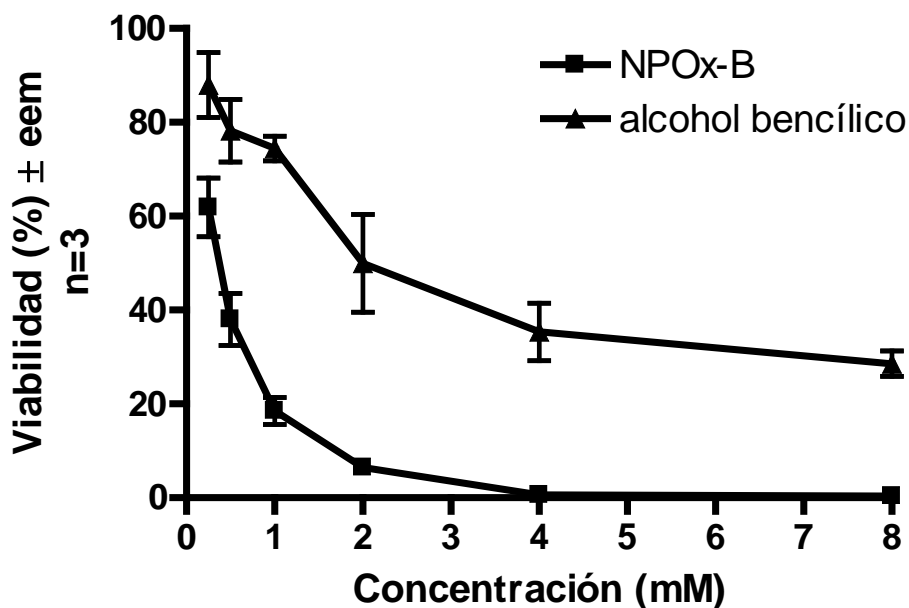


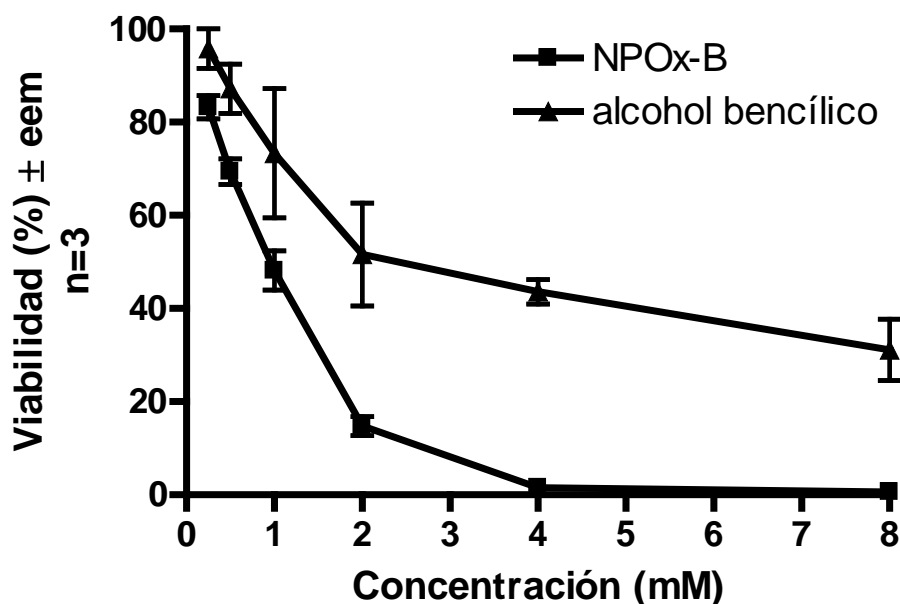
Figura 15. Micrografías representativas del efecto del alcohol bencílico sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa NINOA de *T. cruzi*. Suspensiones de 2×10^6 epimastigotes/mL fueron tratados con el alcohol bencílico durante 60 min de a temperatura ambiente. Se utilizó la tinción de diacetato de fluoresceína (DAF) / yoduro de propidio (PI), que permite observar a los epimastigotes viables fluorescer de verde y a los no viables de rojo (A) control de DMSO 2.5 %, alcohol bencílico (B) 1 mM, (C) 2 mM, (D) 8mM. Observaciones en el microscopio de epi-fluorescencia, con lámpara de halógeno de 100 W y filtro de excitación de 450-490 nm, a un aumento de 40X .

3.2.1. Comparación del efecto tripanomicida del alcohol bencílico con el alcohol etílico y NPOx-B.

Como ya se mencionó, uno de los objetivos de este trabajo fue comparar el efecto tripanomicida y del NPOx-B con el NPOx-Et. Partiendo del hecho de que el NPOx-B y NPOx-Et actúan como profármacos y deben sufrir una hidrólisis produciendo así el alcohol bencílico y etílico, respectivamente. Es por eso que en los siguientes gráficos se muestra el efecto tripanomicida comparativo del NPOx-B, alcohol bencílico y alcohol etílico sobre epimastigotes de la cepa NINOA (Gráfica 6) e INC-5 (Gráfica 7) con la finalidad de observar el comportamiento que presentan y observar si efectivamente el alcohol bencílico es capaz de potenciar el efecto tripanomicida. Como se puede observar, efectivamente el alcohol bencílico presenta actividad tripanomicida pero esta es aproximadamente 40% menor al compararla con NPOx-B a las concentraciones evaluadas en ambas cepas. Lo cual indica claramente que la presencia del alcohol bencílico esta potenciando el efecto tripanomicida.



Gráfica 6. Efecto comparativo del alcohol bencílico y el NPOx-B sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa NINOA de *T. cruzi*. Suspensiones de 2×10^6 epimastigotes/mL fueron tratados con los compuestos a diferentes concentraciones (0.25 – 8 mM) durante 60 min a temperatura ambiente. La viabilidad se determinó por la doble tinción de DAF/PI (Jones y Senft, 1985). Las serie de NPOx-B se tomó de resultados anteriores (Aguirre, 2006).



Gráfica 7. Efecto comparativo del alcohol bencílico y el NPOx-B sobre la viabilidad de epimastigotes de la cepa INC-5 de *T. cruzi*. Suspensiones de 2×10^6 epimastigotes/mL fueron tratados con los compuestos a diferentes concentraciones (0.25 – 8 mM) durante 60 min a temperatura ambiente. La viabilidad se determinó por la doble tinción de DAF/PI (Jones y Senft, 1985). Las serie de NPOx-B se tomó de resultados anteriores (Aguirre, 2006).

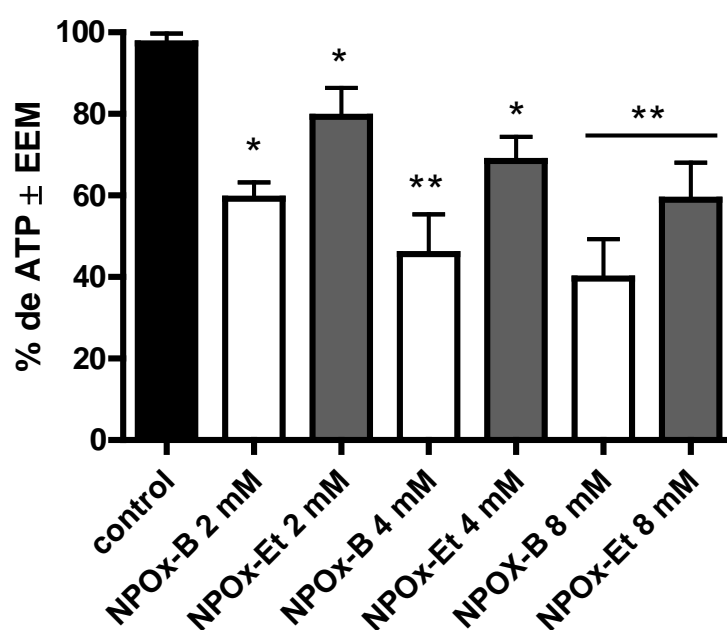
6.3 Efecto del NPOx-Et y NPOx-B sobre el metabolismo energético de *T. cruzi*

3.3.1 Medición de los niveles intracelulares de ATP total en epimastigotes de *T. cruzi*.

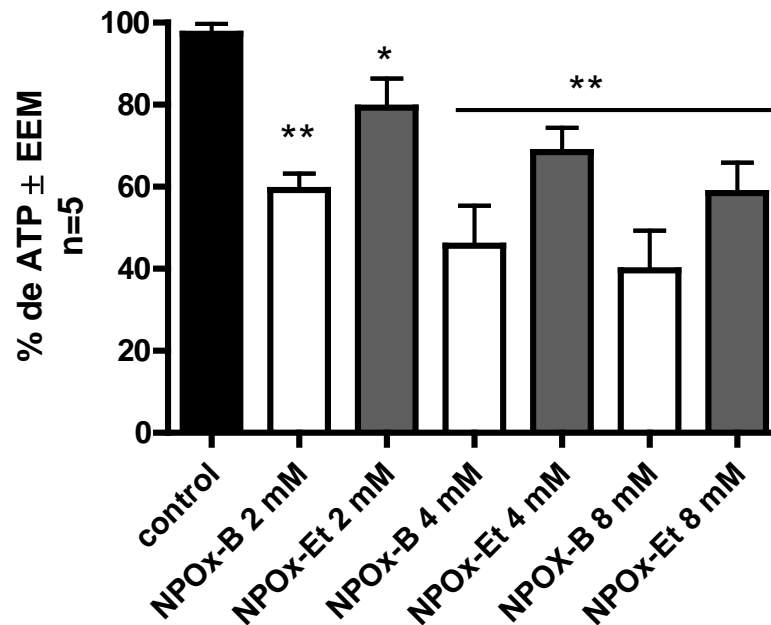
Para la cuantificación del ATP intracelular en los epimastigotes de cada cepa tratados con los ésteres bencílico y etílico del ácido N-propil oxámico, se elaboró curva tipo de ATP (Gráfica 1).

Las concentraciones de los ésteres del ácido N-propil oxámico con las que se trataron a los epimastigotes de la cepa INC-5 y NINOA fueron 2, 4, 8 mM. Los epimastigotes fueron llevados a una suspensión de 1×10^8 células y tratados con los compuestos a temperatura ambiente durante una hora. La concentración más alta

de los compuestos (8 mM) fue la que presentó mayor efecto sobre la reducción de los niveles de ATP intracelular en ambas cepas. En la cepa INC-5 (Gráfica 8) se observó que a la concentración de 2 mM el ATP disminuyó en un 40% con el NPOx-B y 20% con el NPOx-Et, mientras que a la concentración de 4 mM la cantidad de ATP disminuyó en 50% y 30% con el NPOx-B y NPOx-Et, respectivamente. A la mayor concentración de los compuestos (8 mM) se observó el mayor efecto sobre la reducción en el contenido de ATP para ambos compuestos siendo de 60% para el NPOx-B y 40% para el NPOx-Et. Resultados similares se obtuvieron para la cepa NINOA (Gráfica 9), sin embargo esta cepa fue más sensible a la presencia de NPOx-B sobre todo a la concentración de 8 mM donde se presentó una disminución en la cantidad de ATP del 70%. Las tres concentraciones probadas tanto del NPOx-B como del NPOx-Et presentaron una disminución estadísticamente significativa sobre la cantidad intracelular de ATP en epimastigotes de la cepas NINOA e INC-5 de *T. cruzi*.



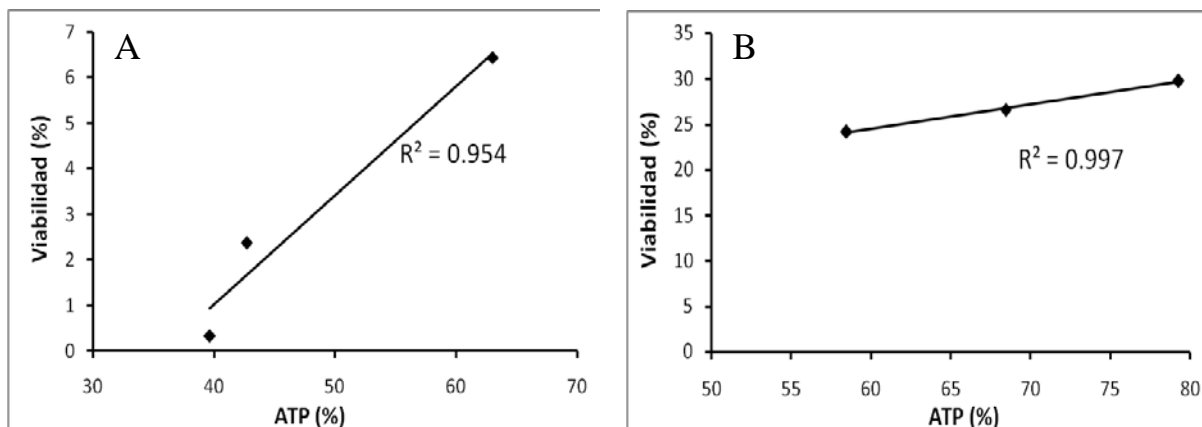
Gráfica 8. Efecto de los ésteres bencílico y etílico del ácido N-propil oxámico sobre los niveles intracelulares de ATP en epimastigotes de la cepa INC-5 de *T. cruzi*. Los epimastigotes se trataron con los compuestos a diferentes concentraciones (2 – 8 mM) durante 60 min. La cantidad de ATP se determinó por la actividad de la luciferasa dependiente de ATP utilizando la metodología propuesta por Luque *et al.*, 2003. Se tomó como 100% a la cantidad de ATP presente en el control (DMSO 2.5%), cuyo contenido de ATP promedio fue de $9.85 \pm 1.27 \mu\text{moles}/1 \times 10^7$ epimastigotes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.



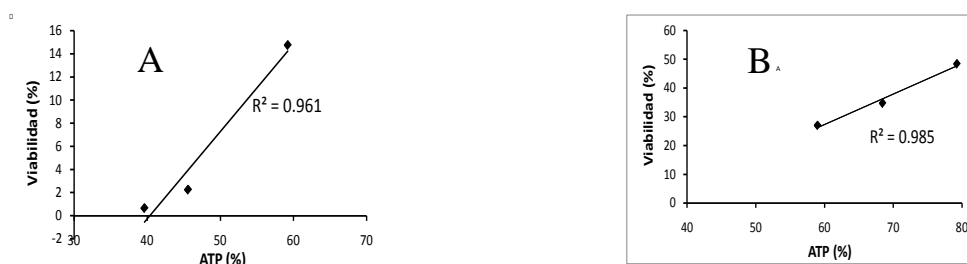
Gráfica 9. Efecto de los ésteres bencílico y etílico del ácido N-propil oxámico sobre los niveles intracelulares de ATP en epimastigotes de la cepa NINOA de *T. cruzi*. Los epimastigotes se trataron con los compuestos a diferentes concentraciones (2 – 8 mM) durante 60 min. La cantidad de ATP se determinó por la actividad de la luciferasa dependiente de ATP utilizando la metodología propuesta por Luque *et al.*, 2003. Se tomó como 100% a la cantidad de ATP presente en el control (DMSO 2.5%), cuyo contenido de ATP promedio fue de 8.84 ± 1.88 pmoles/ 1×10^7 epimastigotes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.3.2. Efecto comparativo de los niveles intracelulares de ATP con la viabilidad de cultivos epimastigotes.

Con la finalidad de verificar si la disminución en la concentración intracelular de ATP se encuentra relacionada con el efecto tripanomicida del NPOx-B y NPOx-Et, se realizaron las siguientes gráficas para determinar si existía alguna correlación entre la cantidad de este metabolito y la viabilidad de epimastigotes de la cepa NINOA (Gráfica 10) e INC-5 (Gráfica 11). Como podemos observar en todos los casos se pudo observar una correlación lineal en estos parámetros con un coeficiente de correlación mayor a 0.9.



Gráfica 10. Correlación del porcentaje de viabilidad de epimastigotes de la cepa NINOA de *T. cruzi* contra el porcentaje intracelular de ATP. Los epimastigotes fueron tratados con los compuestos (A) NPOx-B, (B) NPOx-Et. (2, 4, 8 mM) durante 60 min a temperatura ambiente. R^2 : indica el coeficiente de correlación lineal. Los datos de viabilidad (%) fueron tomados de resultados anteriores (Aguirre, 2006).

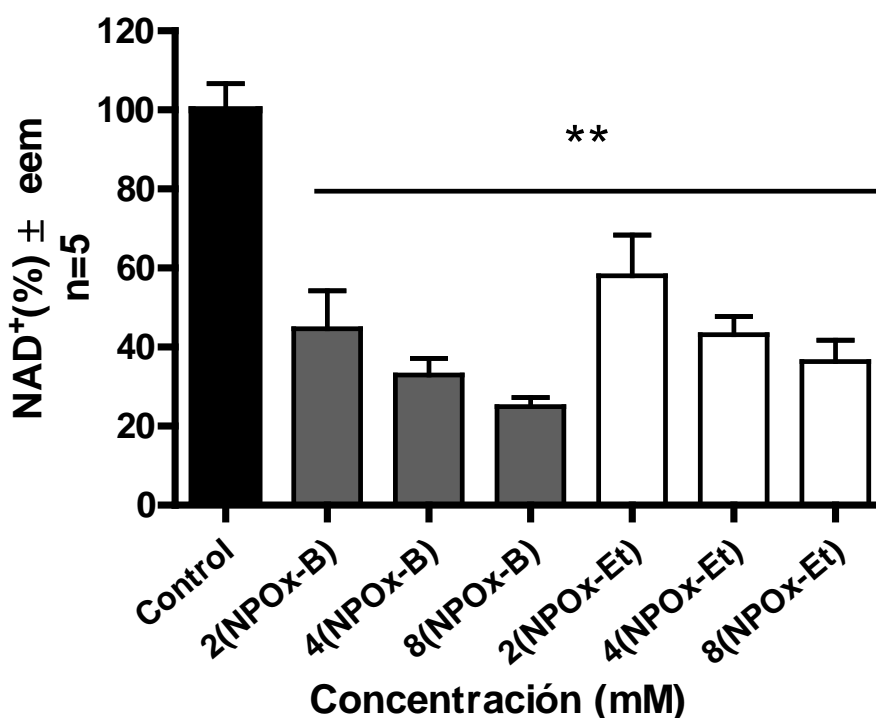


Gráfica 11. Correlación del porcentaje de viabilidad de epimastigotes de la cepa INC-5 de *T. cruzi* contra el porcentaje intracelular de ATP. Los epimastigotes fueron tratados con los compuestos (A) NPOx-B, (B) NPOx-Et. (2, 4, 8 mM) durante 60 min a temperatura ambiente. R^2 : indica el coeficiente de correlación lineal. Los datos de viabilidad (%) fueron tomados de resultados anteriores (Aguirre, 2006).

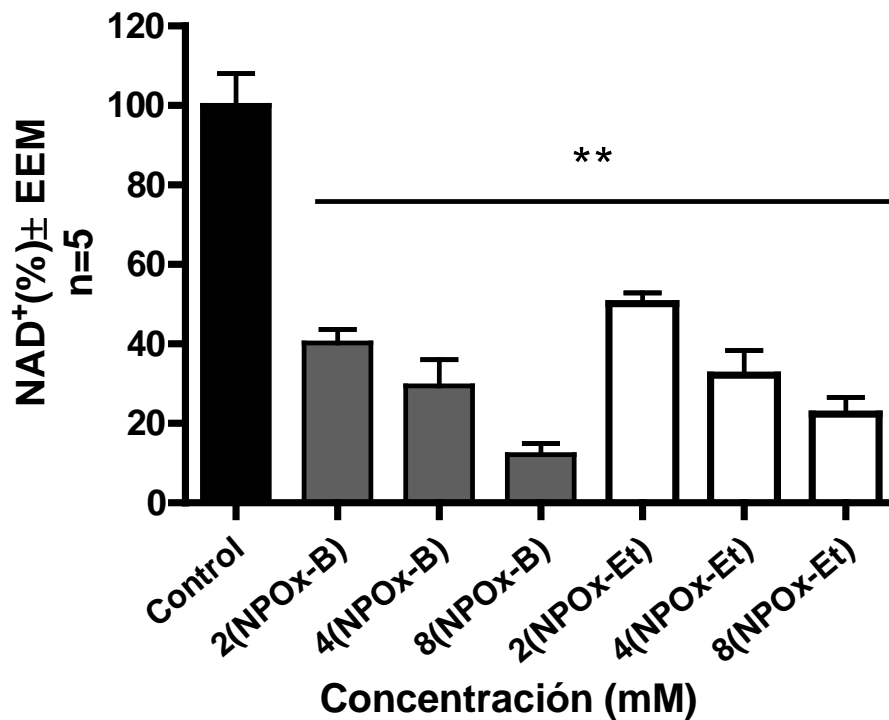
3.3.3 Determinación de la concentración intracelular de NAD^+ en epimastigotes de *T. cruzi*.

Para la determinación de los compuestos sobre el metabolismo energético de *T. cruzi*, se determinaron las concentraciones de NAD^+ intracelular en epimastigotes bajo las mismas condiciones experimentales a las cuales se determinó el efecto sobre la cantidad de ATP, obteniéndose los resultados mostrados en las gráficas 8 y 9 para cepa INC-5 y NINOA, respectivamente. Los epimastigotes de la cepa INC-5

mostraron una disminución en la concentración de NAD^+ de 30%, 40% y 50% cuando fueron tratados con NPOx-Et a las concentraciones de 2 mM ,4 mM y 8 mM respectivamente. Mientras que cuando compuesto de prueba fue el NPOx-B la disminución en concentración de NAD^+ fue de 50% para la concentración de 2 mM, 60% para 4 mM y 70% para 8 mM (Gráfica 12). Los epimastigotes de la cepa NINOA presentaron un comportamiento similar que la cepa INC-5, siendo el compuesto más efectivo sobre la disminución en la concentración intracelular del NAD^+ el NPOx-B en comparación con el NPOx-Et y al igual que para la determinación de la cantidad de ATP, esta cepa resultó ser más sensible a la presencia de ambos compuestos (Gráfica 13)



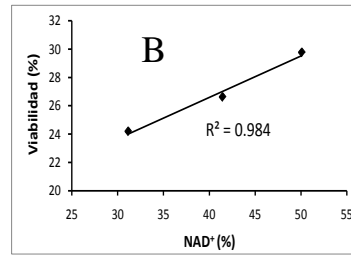
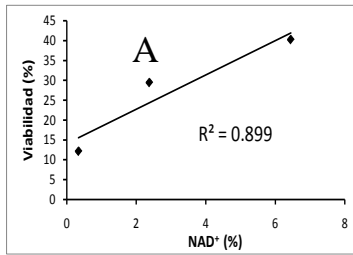
Gráfica 12. Efecto de los ésteres bencílico y etílico del ácido N-propil oxámico sobre la concentración intracelular de NAD^+ en epimastigotes de la cepa INC-5 de *T. cruzi*. Los epimastigotes fueron tratados con NPOx-Et o NPOx-B (2 – se 8mM) durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente se determinó la concentración de NAD^+ por la actividad de la alcohol deshidrogenasa (Klingenberg, 1989). Se tomó como 100% al control (DMSO 2.5%) cuya concentración de NAD^+ promedio fue de 14.14 ± 2.10 8.84 ± 1.88 $\mu\text{M}/1 \times 10^7$ epimastigotes. **** $P < 0.01$**



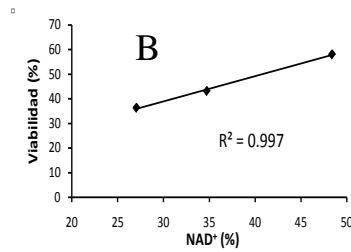
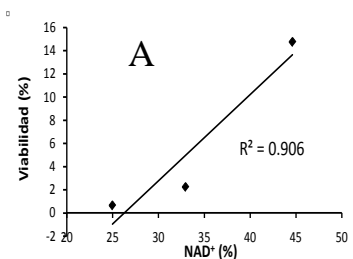
Gráfica 13. Efecto de los ésteres bencílico y etílico del ácido N-propil oxámico sobre la concentración intracelular de NAD⁺ en epimastigotes de la cepa NINOA de *T. cruzi*. Los epimastigotes fueron tratados con NPOx-Et o NPOx-B (2 – se 8mM) durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente se determinó la concentración de NAD⁺ por la actividad de la alcohol deshidrogenasa (Klingenberg, 1989). Se tomó como 100% al control (DMSO 2.5%) cuya concentración de NAD⁺ promedio de $15.80 \pm 2.84 \mu\text{M}/1 \times 10^7$ epimastigotes. ** $P < 0.01$

3.3.4. Efecto comparativo de la cantidad de NAD⁺ con la viabilidad de cultivos epimastigotes.

De igual modo se decidió analizar si la disminución en el metabolismo energético específicamente midiendo la concentración intracelular de NAD⁺ se encontraba relacionada con el efecto tripanomicida del NPOx-B y NPOx-Et. Por lo que se realizaron las siguientes gráficas para determinar si existía alguna correlación entre la concentración de este metabolito y la viabilidad de epimastigotes de la cepa NINOA (Gráfica 14) e INC-5 (Gráfica 15). Como podemos observar en todos los casos se pudo observar una correlación lineal en estos parámetros con un coeficiente de correlación mayor a 0.9.



Gráfica 14. Correlación de viabilidad de epimastigotes de la cepa NINOA de *T. cruzi* contra el porcentaje intracelular de NAD⁺. Tratamiento con 2 mM, 4 mM, 8 mM durante 60 min de. (A) NPOx-B, (B) NPOx-Et. R²: coeficiente de correlación lineal. Los datos de % de viabilidad fueron tomados de resultados anteriores (Aguirre, 2006).



Gráfica 15. Correlación de viabilidad de epimastigotes de la cepa INC-5 de *T. cruzi* contra el porcentaje intracelular de NAD⁺. Tratamiento con 2 mM, 4 mM, 8 mM durante 60 min de (A) NPOx-B, (B) NPOx-Et. R²: coeficiente de correlación lineal. Los datos de % de viabilidad fueron tomados de resultados anteriores (Aguirre, 2006).

3.4 Determinación de la toxicidad del NPOx-Et y NPOx-B *in vitro* sobre la viabilidad de cultivos celulares.

El efecto del NPOx-Et y NPOx-B sobre la viabilidad de células Vero se evaluó a las 72 h de tratamiento utilizando azul tripano como colorante de exclusión. Las figura 16, gráfica 16 y gráfica 17 muestran el efecto del NPOx-Et y NPOx-B sobre la viabilidad celular. Tomando como 100% al control de DMSO 2% podemos observar que la viabilidad celular es mayor al 80% hasta la concentración de 1.25 mM para

ambos compuestos. El mayor efecto citotóxico se observó a la concentración más alta evaluada (2.5 mM), siendo del 20% con el NPOx-Et (Gráfica 16) y del 40% con el NPOx-B (Gráfica 17).

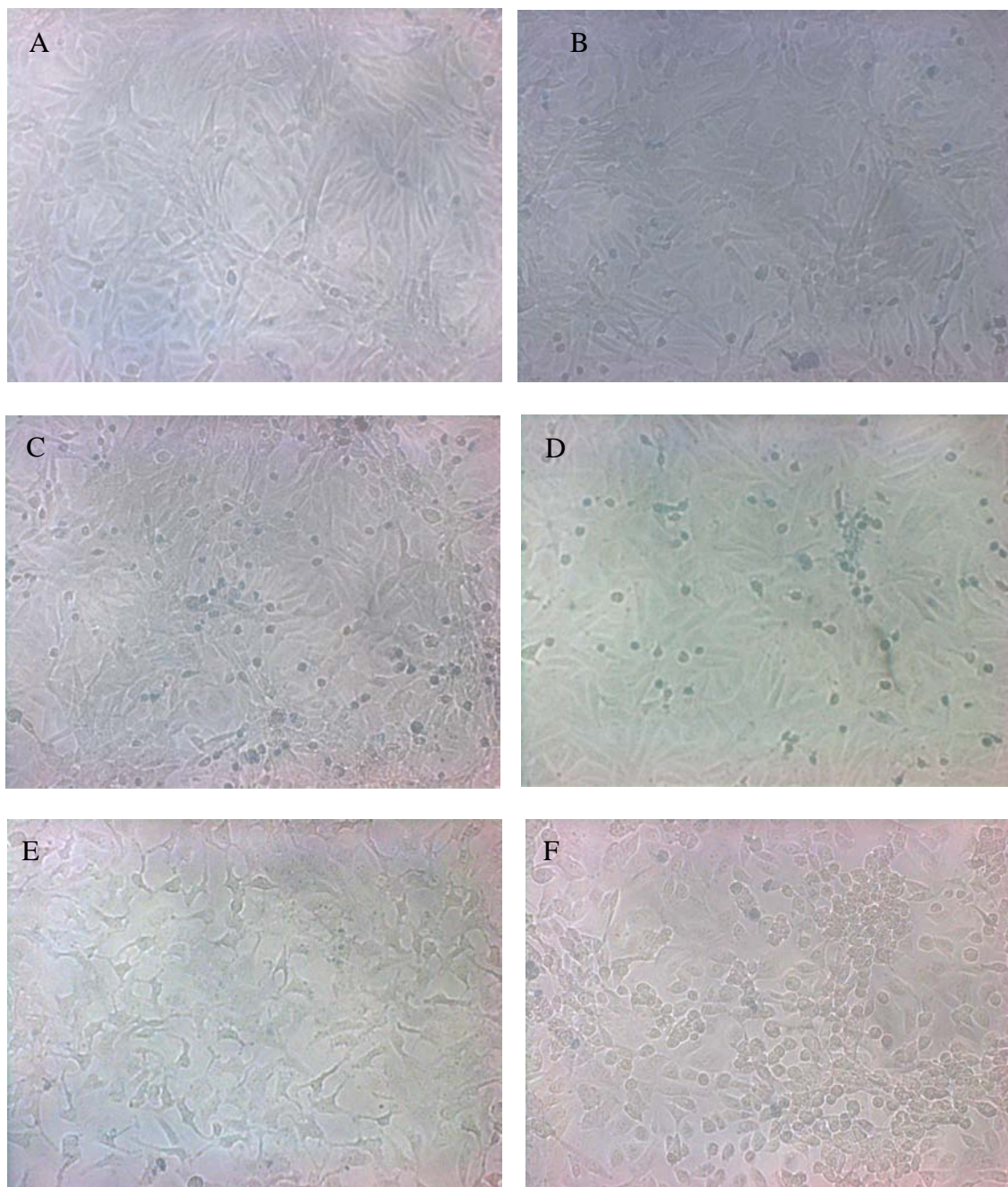
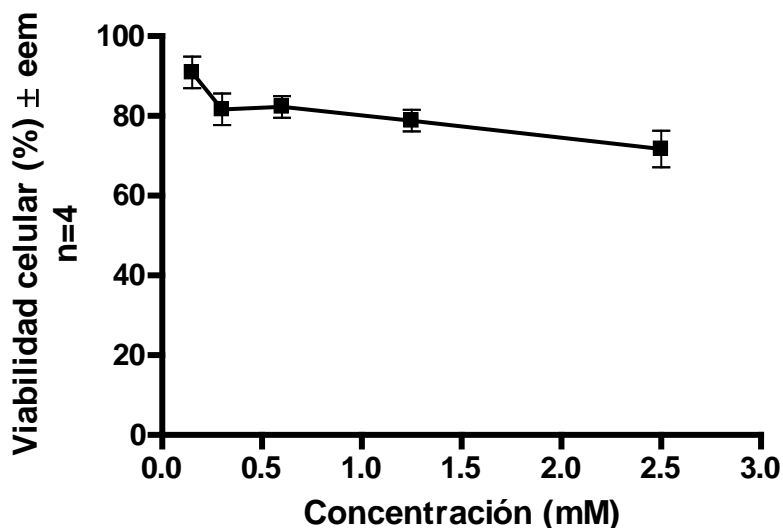
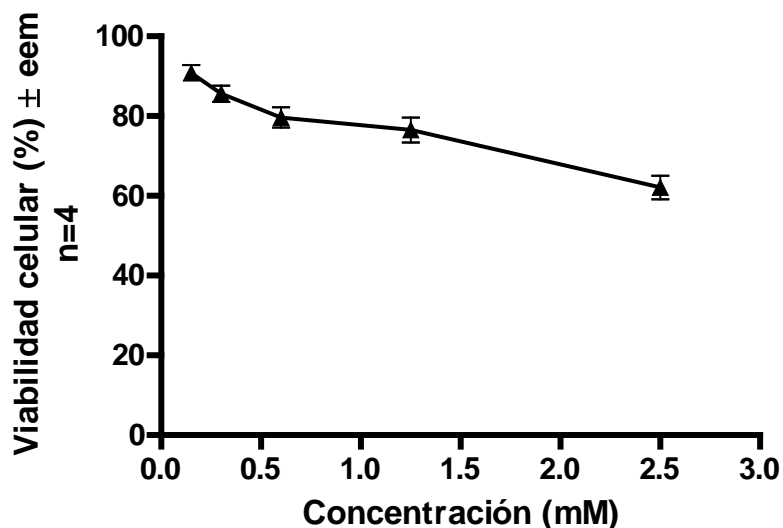


Figura 16. Micrografías representativas del efecto del NPOx-Et y NPOx-B sobre la viabilidad de células Vero. Monocapas de 2×10^5 células por pozo fueron incubadas con los compuestos durante 72 h a 37°C , .5% de CO_2 . (A) Testigo (B) DMSO 2%, (C) y (D) 0.6 mM de NPOx-Et y NPO-B respectivamente, (E) y (F) 2.5 mM de NPOx-Et y NPOx-B respectivamente. 40X

Como se puede ver en la figura 15 (E, F) a la concentración 2.5 mM tanto del NPOx-Et como el NPOx-B, a pesar no encontrar una gran cantidad de células teñidas con el colorante de exclusión, éstas cambian su morfología lo cual es un indicativo de citotoxicidad



Gráfica 16. Efecto del NPOx-Et sobre la viabilidad de células Vero. Monocapas de aproximadamente 2×10^5 células/pozo fueron expuestas al NPOx-Et durante 72h. La viabilidad se determinó utilizando como colorante de exclusión el azul tripano.

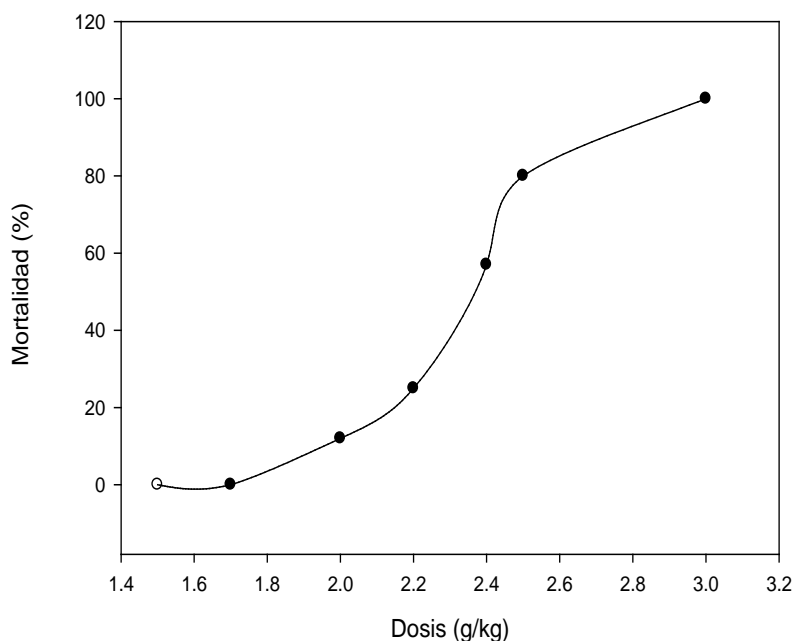


Gráfica 17. Efecto del NPOx-B sobre la viabilidad de células Vero. Monocapas de aproximadamente 2×10^5 células/pozo fueron expuestas al NPOx-Et durante 72h. La viabilidad se determinó utilizando como colorante de exclusión el azul tripano.

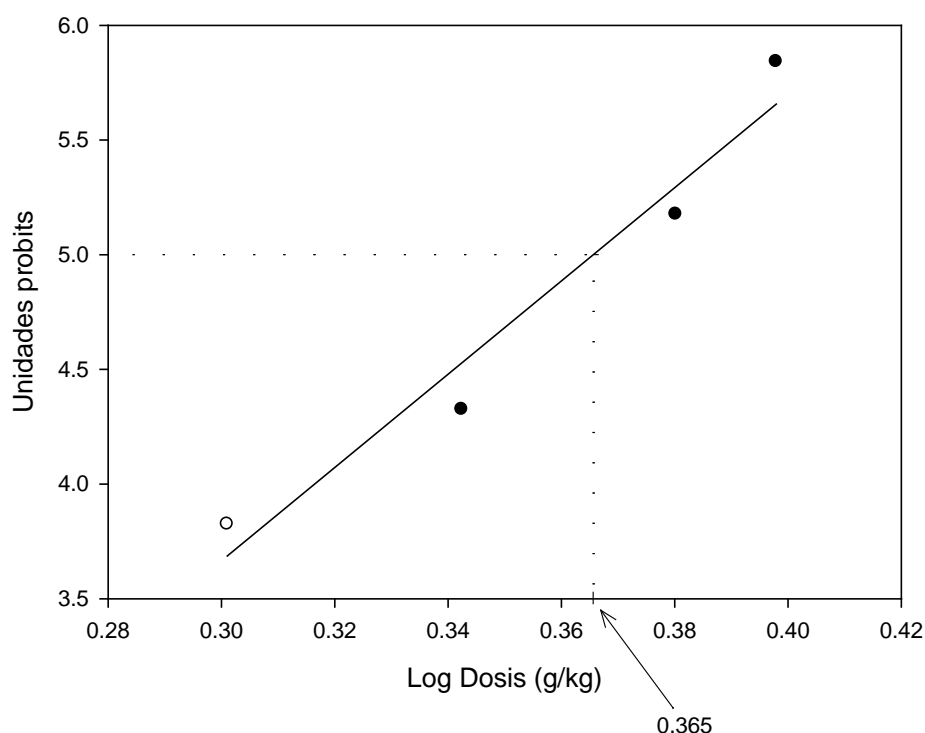
3.5 Determinación de la toxicidad oral aguda del NPOx-Et y NPOx-B.

La determinación de la dosis letal al cincuenta por ciento o media (DL_{50}) del NPOx-Et puede observarse en la gráfica 18. Se utilizaron lotes de tres ratones por cada dosis y como vehículo aceite de maíz. Los resultados muestran la clásica curva sigmoidea dosis/respuesta donde a la dosis de 1.5 g/kg no se produjo la muerte a ninguno de los animales y a la dosis de 3.0 g/kg ocasionó el 100% de muerte en los animales de prueba. Para obtener el valor de la DL_{50} , se transformó la respuesta de mortalidad a unidades probits y se construyó contra el logaritmo de la dosis como se muestra en la gráfica 19. De acuerdo a esta gráfica, el valor de la dosis letal cincuenta fue de 2.32 g/kg, el cual es el resultado del antilogaritmo de 0.365 (valor del cincuenta por ciento de la respuesta).

En cuanto a la toxicidad aguda producida por NPOx-B se administraron los lotes como se muestra en la tabla 3. Sin embargo, pudieron administrar dosis más altas de 2.0 g/kg por problemas de solubilidad del compuesto.



Gráfica 18. Curva dosis respuesta (mortalidad) del NPOx-Et. La administración se realizó por vía oral en ratones macho de la cepa CD-1 usando como vehículo aceite de maíz.



Gráfica 19. Curva de logaritmo de la dosis contra unidades probits del NPOx-Et. La gráfica fue construida a partir de los datos de la gráfica 18. La DL_{50} calculada para el NPOx-Et obtenida por interpolación en la gráfica es de 2.32 g/kg de peso.

3.6 Efecto tripanomicida de los ésteres etílico y bencílico del ácido N-propil oxámico *in vivo*.

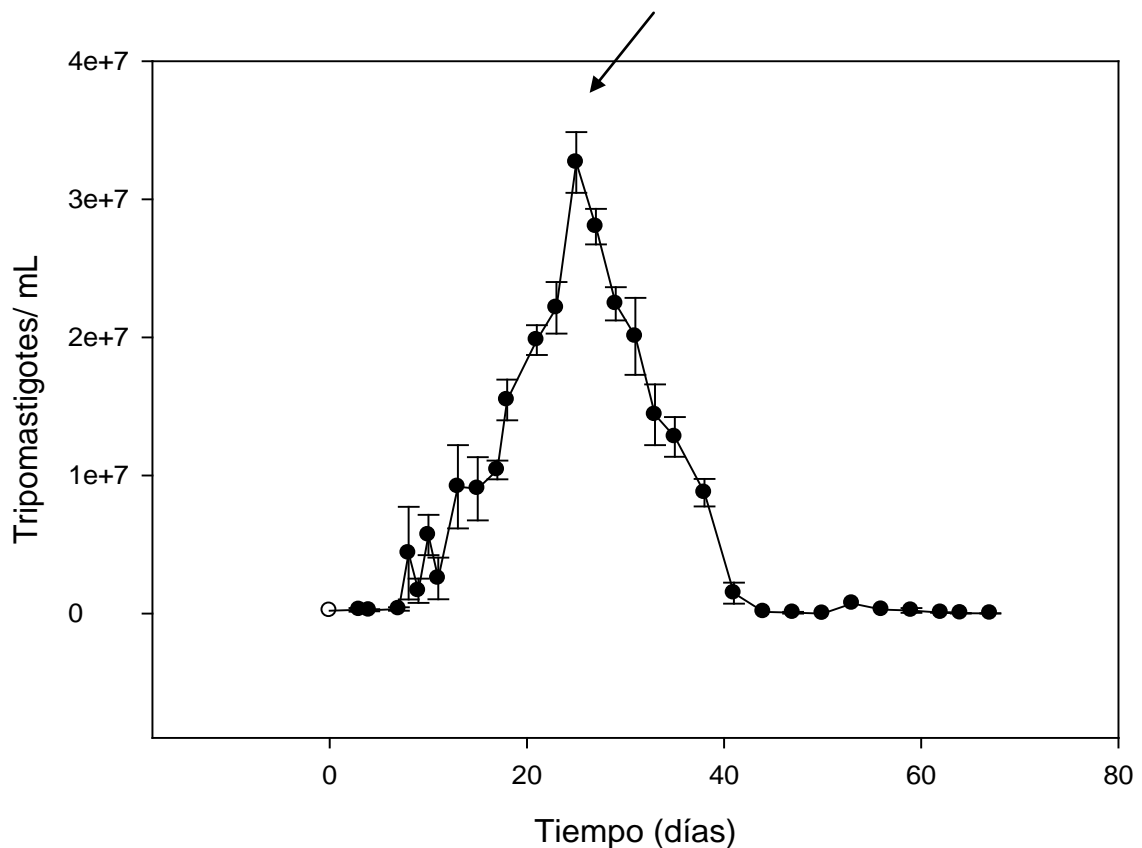
3.6.1 Efecto tripanomicida del NPOx-Et y NPOx-B administrados a corto plazo por el método de Filardi y Brener, 1984.

Para la determinación del efecto de los compuestos a corto plazo *in vivo* se determinaron las curvas de parasitemia en el modelo murino para la infección con la cepa NINOA e INC-5 de *T. cruzi*. Tras la inoculación con 1×10^5 tripomastigotes sanguíneos a lotes de 6 ratones (hembra) de la cepa CD-1, se monitoreó la parasitemia cada tercer día mediante el método de Pizzi anteriormente descrito en la sección de materiales y métodos. Para la cepa NINOA el máximo de la parasitemia se alcanzó en el día 24 (Gráfica 20) con un promedio de 3.5×10^7

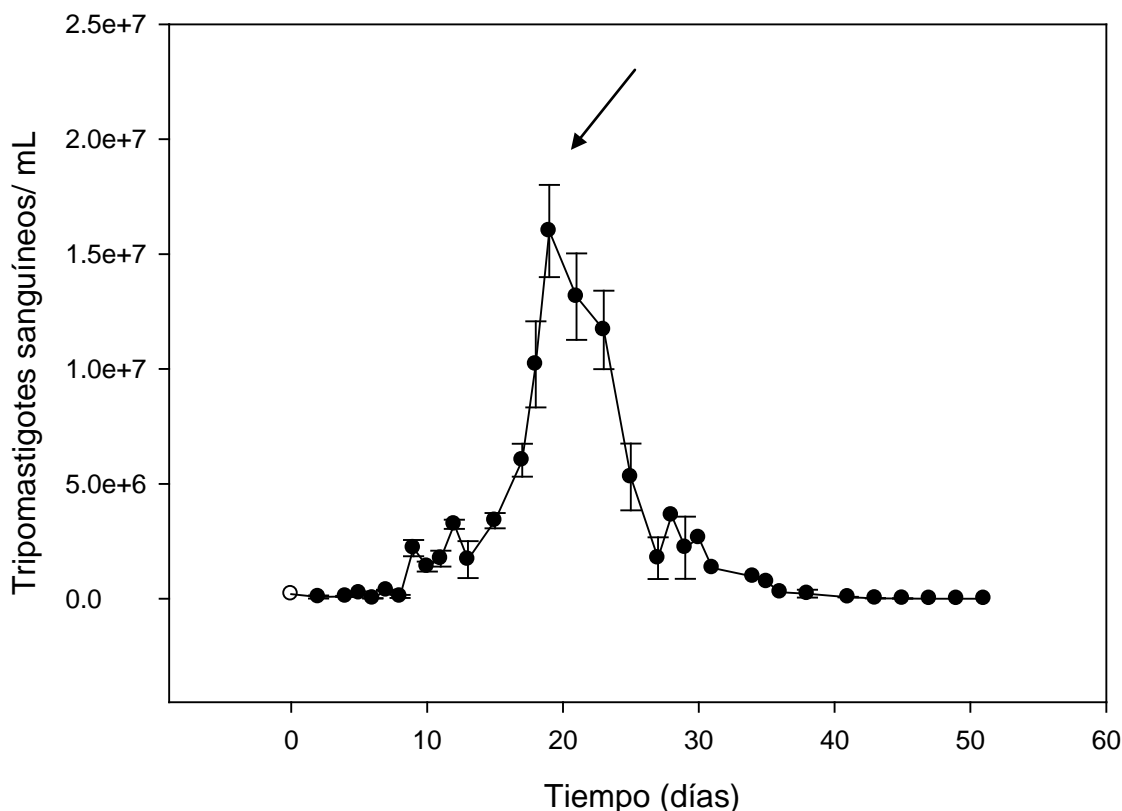
tripomastigotes/mL. Mientras que para la cepa INC-5 el máximo se presentó en el día 18 en una cantidad de 1.5×10^7 tripomastigotes/mL (Gráfica 21). Las características biológicas de cada cepa se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Características biológicas de las cepas NINOA e INC-5 de *T. cruzi*.

CARACTERISTICA		NINOA	INC-5
Curvas de parasitemia en ratón	Periodo prepatente	8 días	10 días
	Pico máximo de parasitemia	25 días	18 días
	Periodo patente	40 días	35 días



Gráfica 20. Curva de parasitemia de ratones infectados con la cepa NINOA de *T. cruzi*. La flecha indica el día al que se alcanza el máximo de la parasitemia (día 25). La curva se determinó en un lote de cinco ratones hembra de la cepa CD-1 inoculados con 1×10^5 tripomastigotes sanguíneos.

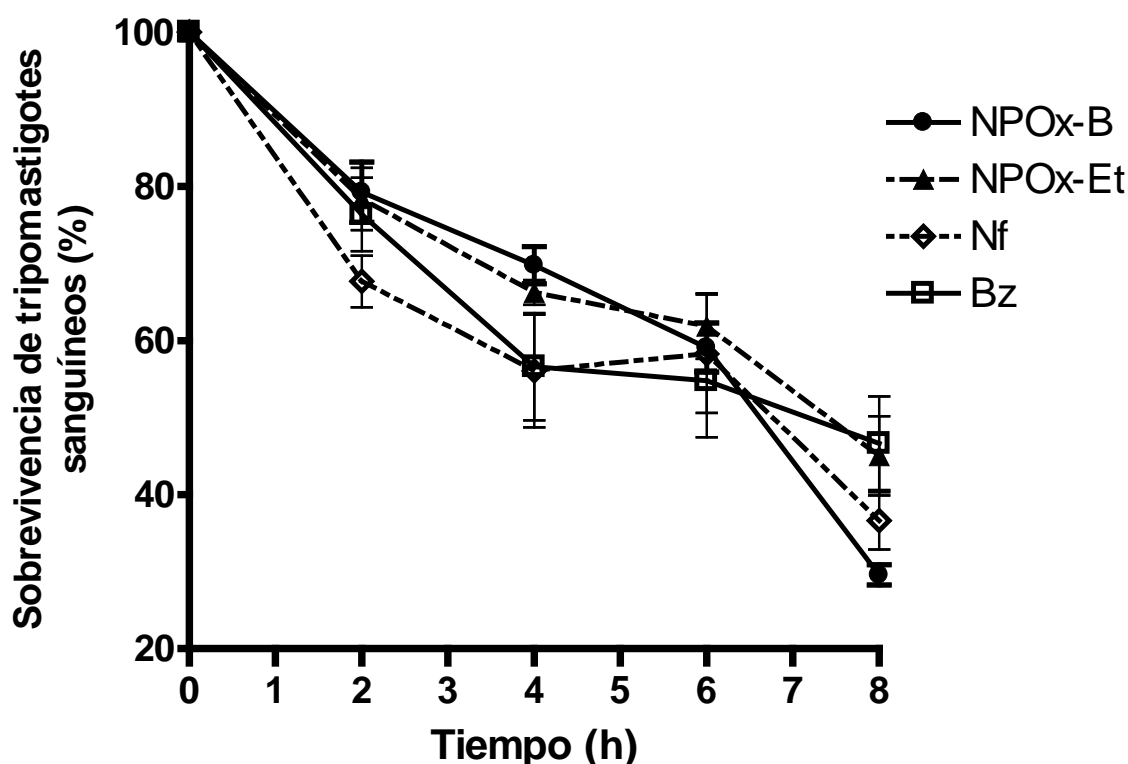


Gráfica 21. Curva de parasitemia de ratones infectados con la cepa INC-5 de *T. cruzi*. La flecha indica el día al que se alcanza el máximo de la parasitemia (día 18). La curva se determinó en un lote de cinco ratones hembra de la cepa CD-1 inoculados con 1×10^5 tripomastigotes sanguíneos.

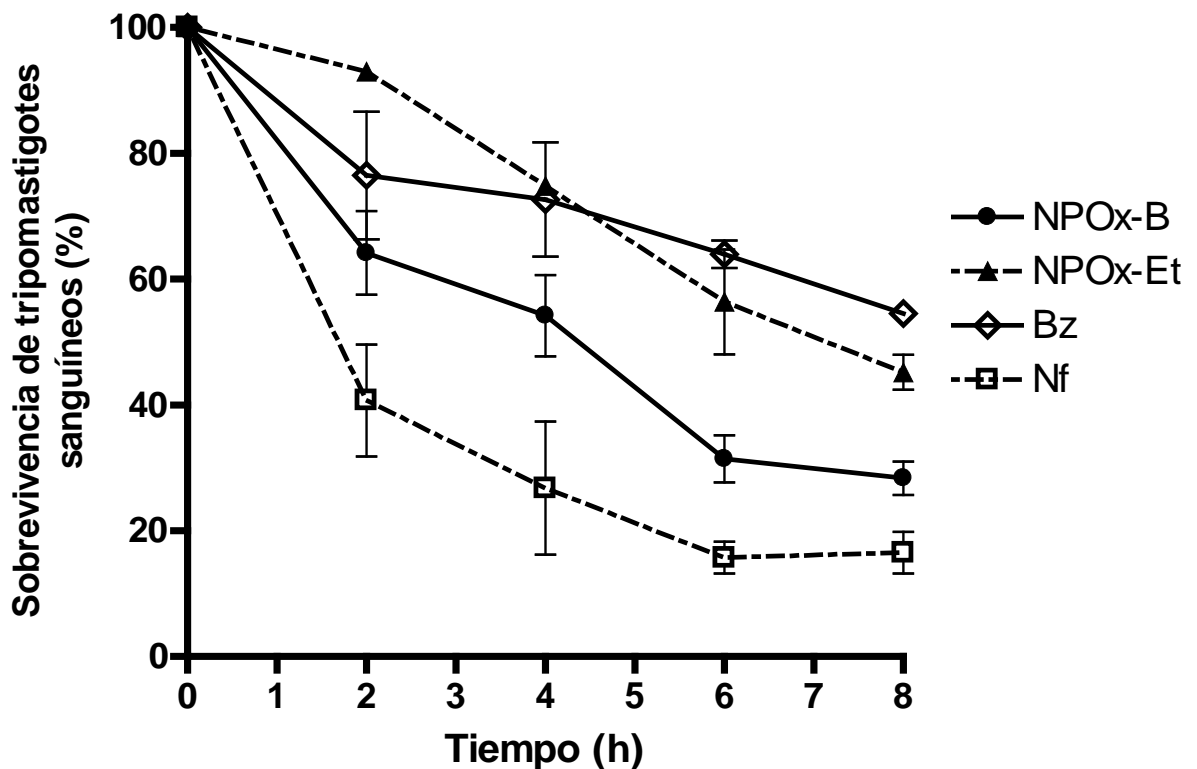
Posteriormente, en el máximo de la parasitemia los ratones fueron tratados por vía oral con una sola dosis de 500 mg/kg de los compuestos NPOx-B, NPOx-Et, Nf, Bz, para cada lote, usando como vehículo aceite de maíz. Inmediatamente después del tratamiento se monitoreó la parasitemia y posteriormente cada dos horas durante ocho horas. Los ratones tratados con Nf o Bz se usaron como referencia para comparar el efecto de los derivados del ácido oxámico con el efecto de los fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

El mayor efecto sobre la disminución en la concentración de tripomastigotes circulantes de los diferentes compuestos después de la administración única del fármaco, se alcanzó a las ocho horas para todos los compuestos en ambas cepas de *T. cruzi*. A este tiempo el compuesto más efectivo en la cepa NINOA de *T. cruzi*

fue el NPOx-B el cual redujo la concentración de tripomastigotes sanguíneos hasta en un 70%, este efecto fue comparativamente mayor al producido por el NPOx-Et cuya disminución fue del 50% y al de los fármacos de referencia Nf y Bz cuya reducción fue de 60% y 50%, respectivamente (Gráfica 22). Mientras que para la cepa INC-5 el compuesto con mejor actividad tripanomicida fue el Nf alcanzando una disminución de la parasitemia del 80% seguido del NPOx-B con 70% de reducción en la concentración de tripomastigotes circulantes. Así mismo el NPOx-Et produjo una disminución en la parasitemia de 50%, mayor que la producida por Bz que fue de 30% para ratones infectados con la cepa INC-5 de *T. cruzi* (Gráfica 23). Es importante mencionar que el fármaco de referencia Bz fue el que presentó menos efecto tripanomicida en comparación con el otro fármaco de referencia el Nf, así como con los ésteres del ácido oxámico en las dos cepas de *T. cruzi* evaluadas.



Gráfica 22. Efecto de los diferentes compuestos sobre la parasitemia de ratones infectados con la cepa NINOA de *T. cruzi*. Los compuestos se administraron en una sola dosis de 500 mg/kg por vía oral usando como vehículo aceite de maíz e inmediatamente después del tratamiento se monitoreó la parasitemia cada dos horas durante ocho horas.



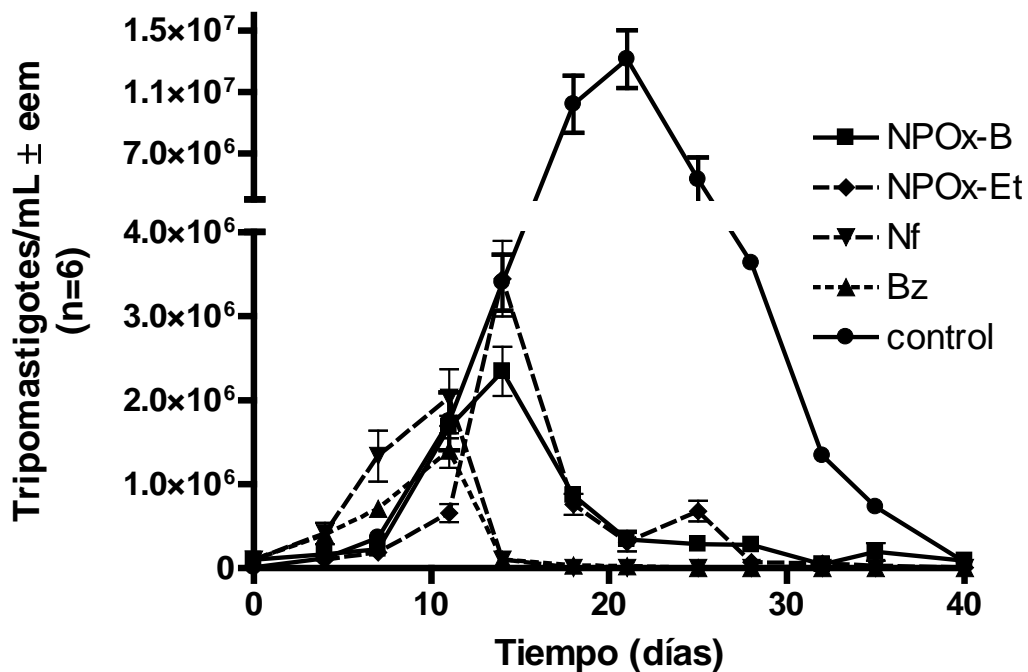
Gráfica 23. Efecto de los diferentes compuestos sobre la parasitemia de ratones infectados con la cepa INC-5 de *T. cruzi*. Los compuestos se administraron en una sola dosis de 500 mg/kg por vía oral usando como vehículo aceite de maíz e inmediatamente después del tratamiento se monitoreó la parasitemia y cada dos horas durante ocho horas.

3.6.2 Efecto tripanomicida del NPOx-Et y NPOx-B administrados a largo plazo.

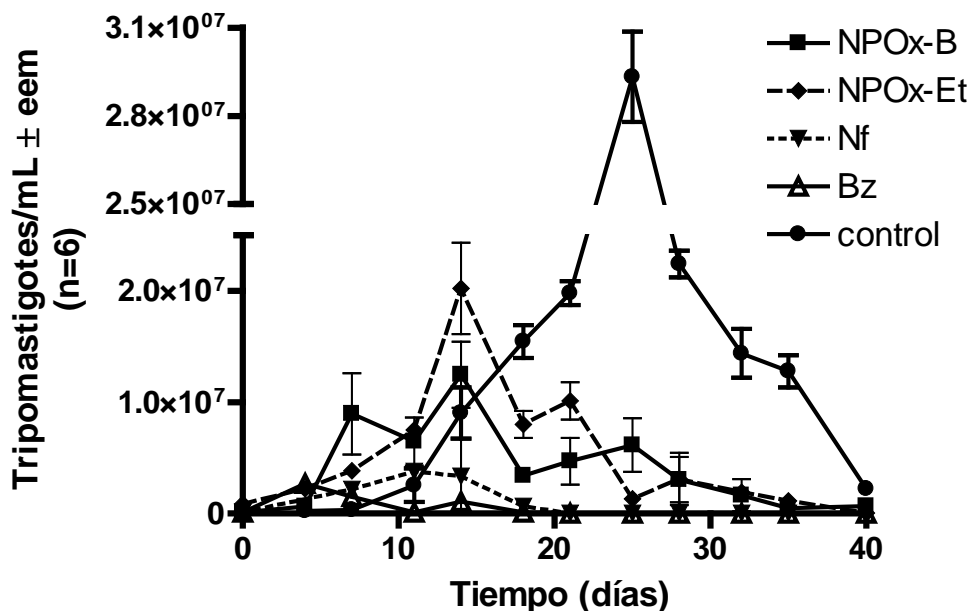
Para evaluar el efecto *in vivo* del NPOx-B en comparación con el NPOx-Et y con los fármacos de referencia Nf y Bz bajo administración prolongada (largo plazo) ratones infectados con las cepas NINOA o INC-5 de *T. cruzi* fueron administrados por vía oral con una dosis diaria de 100 mg/kg de cada uno de los compuestos durante 40 días. Se determinó la parasitemia cada tercer día y los resultados obtenidos en ratones infectados con la cepa INC-5 de *T. cruzi* se muestran en la gráfica 24. Se puede observar que el máximo de la parasitemia con los cuatro compuestos evaluados se presentó antes que el control (vehículo). El lote de ratones tratados

con NPOx-B y NPOx-Et presentaron el máximo en la parasitemia en el día 14 con una diferencia del control que lo presentó el día 21. La disminución en la parasitemia debida al tratamiento con el NPOx-B en el máximo fue de aproximadamente 70% con el NPOx-Et y 79% con el NPOx-B en comparación con el control. Por otro lado, el Nf y Bz presentaron el máximo en la parasitemia en el día 10 y la disminución en la parasitemia observada en este día fue de aproximadamente 84% y 92%, respectivamente.

De igual forma ratones infectados con la cepa NINOA de *T. cruzi* (Gráfica 25) el tratamiento con los diferentes compuestos provocó un desplazamiento del día del máximo de la parasitemia al compararla con el control que lo presentó en el día 26. Con el tratamiento con NPOx-Et y el NPOx-B el máximo se presentó igualmente que en la cepa INC-5 de *T. cruzi* en el día 15 y la disminución en la misma en este máximo fue del 35%, mientras que con el NPOx-B fue de 60% con respecto al control (vehículo). En el caso de los fármacos de referencia evaluados Nf y Bz el máximo se observó en el día 11 para Nf con una disminución de la parasitemia de 87% y 7 para Bz con una disminución en la cantidad de parásitos circulantes de 94% al compararlos con la parasitemia máxima del control (vehículo) tomada como 100%. Cabe señalar que para ambas cepas al comparara el efecto del NPOx-B con el del NPOx-Et sobre la disminución en la parasitemia, el derivado bencílico presentó un mayor efecto en la disminución de este parámetro.



Gráfica 24. Curvas de parasitemia de ratones infectados con la cepa INC-5 de *T. cruzi* y bajo tratamiento con los diferentes compuestos. Los compuestos se administraron en una dosis diaria de 100 mg/kg por vía oral usando como vehículo aceite de maíz durante 40 días. La parasitemia se determinó cada tercer día.

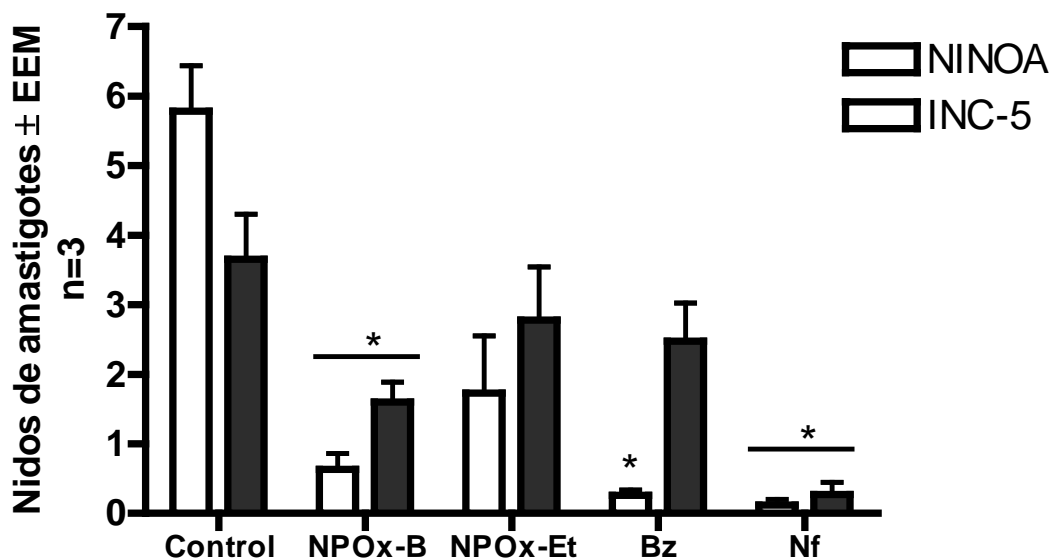


Gráfica 25. Curvas de parasitemia de ratones infectados con la cepa NINOA de *T. cruzi* y bajo tratamiento con los diferentes compuestos. Los compuestos se administraron en una dosis diaria de 100 mg/kg por vía oral usando como vehículo aceite de maíz durante 40 días. La parasitemia se determinó cada tercer día.

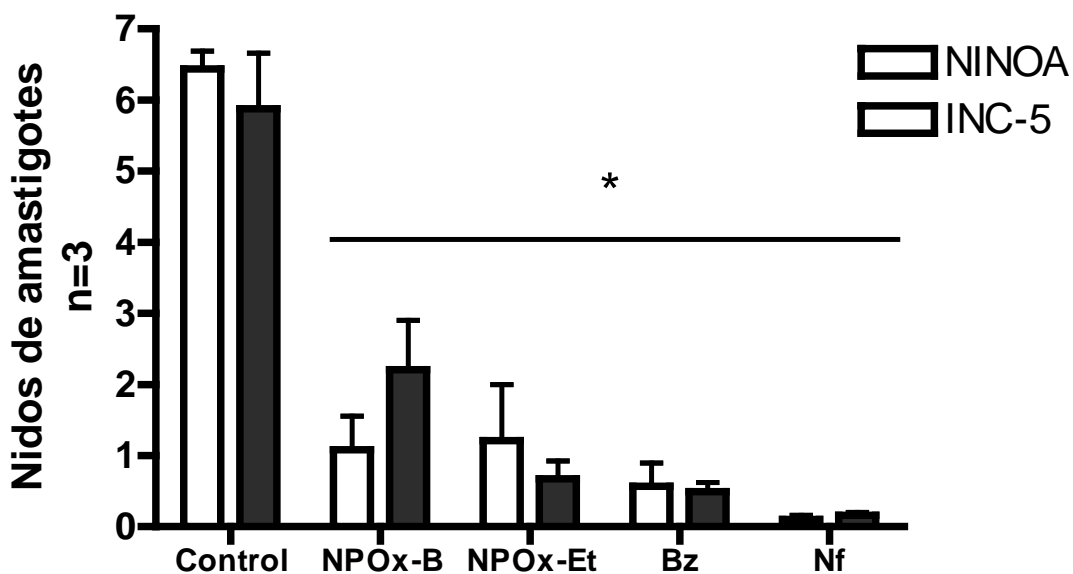
3.6.3. Evaluación de la presencia de nidos de amastigotes en músculo esquelético y cardíaco después del tratamiento con NPOx-B, NPOx-Et, Nf y Bz.

Una vez transcurridos los cuarenta días de tratamiento con los compuestos, los fueron sacrificados para determinar el efecto de estos sobre los nidos de amastigotes en dos tipos de tejidos en específico: músculo esquelético y cardíaco (Figuras 16 y 17 respectivamente) . Se determinó el número de amastigotes en tres secciones del tejido tomadas al azar por tratamiento y se contó el número de amastigotes presente en cada sección. Los resultados obtenidos en el músculo cardíaco se muestran en la gráfica 26 y en el músculo esquelético se muestran en la figura 19. Como podemos observar la disminución en el número de nidos de amastigotes presentes en el corazón fue estadísticamente significativa para el lote de ratones tratados con NPOx-B y con el fármaco de referencia Nf para ambas cepas. Mientras que para ratones infectados con la cepa NINOA, el tratamiento con Bz también redujo significativamente el número de nidos de amastigotes presentes en este tejido. La disminución en la presencia de nidos fue de aproximadamente 83% y 50% para ratones infectados con la cepa NINOA e INC-5 respectivamente tratados con NPOx-B estos porcentajes fueron mayores que los presentados por el NPOx-Et que fueron de 65% y 25% para las cepas NINOA e INC-5 tomando como 100% el número de nidos del grupo control (tratamiento con vehículo). Por otro lado la disminución en lo nidos de amastigotes debido al tratamiento con los fármacos de referencia fueron de 95% y 30% con el Bz y de 100% y 95% con el Nf para las cepas NINOA e INC-5, respectivamente.

En el músculo esquelético, todos los compuestos evaluados redujeron de manera significativa el número de nidos de amastigotes. Tomando de igual modo que para el músculo cardíaco como 100% al control de cada cepa se observó que el NPOx- Et presentó una mayor actividad que el NPOx-B en la cepa INC-5. El NPOx-Et redujo el número de nidos de amastigotes en un 74% y en un 87% en la cepa NINOA e INC-5 respectivamente, mientras que el NPOx-B lo hizo en un 75% y 60%. Así mismo los fármacos de referencia Bz y Nf disminuyeron los nidos de amastigotes en un 88% y 100% respectivamente en la cepa NINOA y en 90% y 99% en la cepa INC-5.



Gráfica 26. Nidos de amastigotes presentes en músculo cardíaco. Número de nidos por laminilla después de 40 días de tratamiento con NPOx-B, NPOx-Et, Bz y Nf a una dosis de 100 mg/kg/día. Los nidos de amastigotes se contaron al microscopio con la tinción de Hematoxilina- eosina. * $P < 0.05$



Gráfica 27. Nidos de amastigotes presentes en músculo esquelético. Número de nidos por laminilla después de 40 días de tratamiento con NPOx-B, NPOx-Et, Bz y Nf a una dosis de 100 mg/kg/día. Los nidos de amastigotes se contaron al microscopio con la tinción de Hematoxilina- eosina. * $P < 0.05$

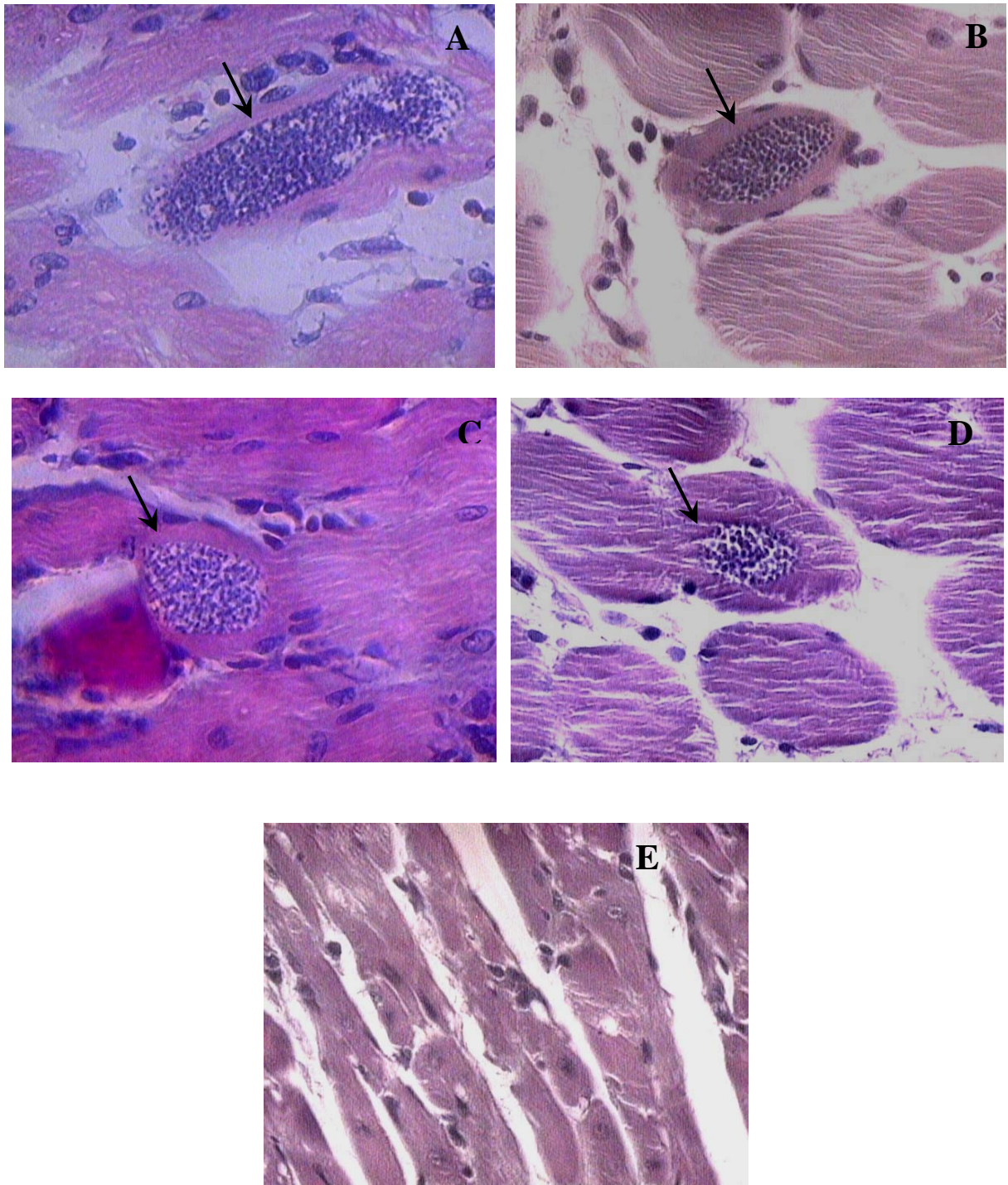


Figura 17. Micrografías representativas de cortes de músculo cardíaco que muestran los nidos de amastigotes presentes en este tejido en ratones infectados con la cepa NINOA de *T. cruzi*. Las flechas señalan los nidos de amastigotes teñidos por la técnica de Hematoxilina-Eosina. Los cortes se obtuvieron de órganos de ratones tratados durante 40 días con dosis de 100 mg/kg/día de (A) Control sin tratamiento (vehículo), (B) NPOx-B, (C) NPOx-Et, (D) Bz, (E)Nf. Aumento de 40X y una ampliación de la cámara de 10X

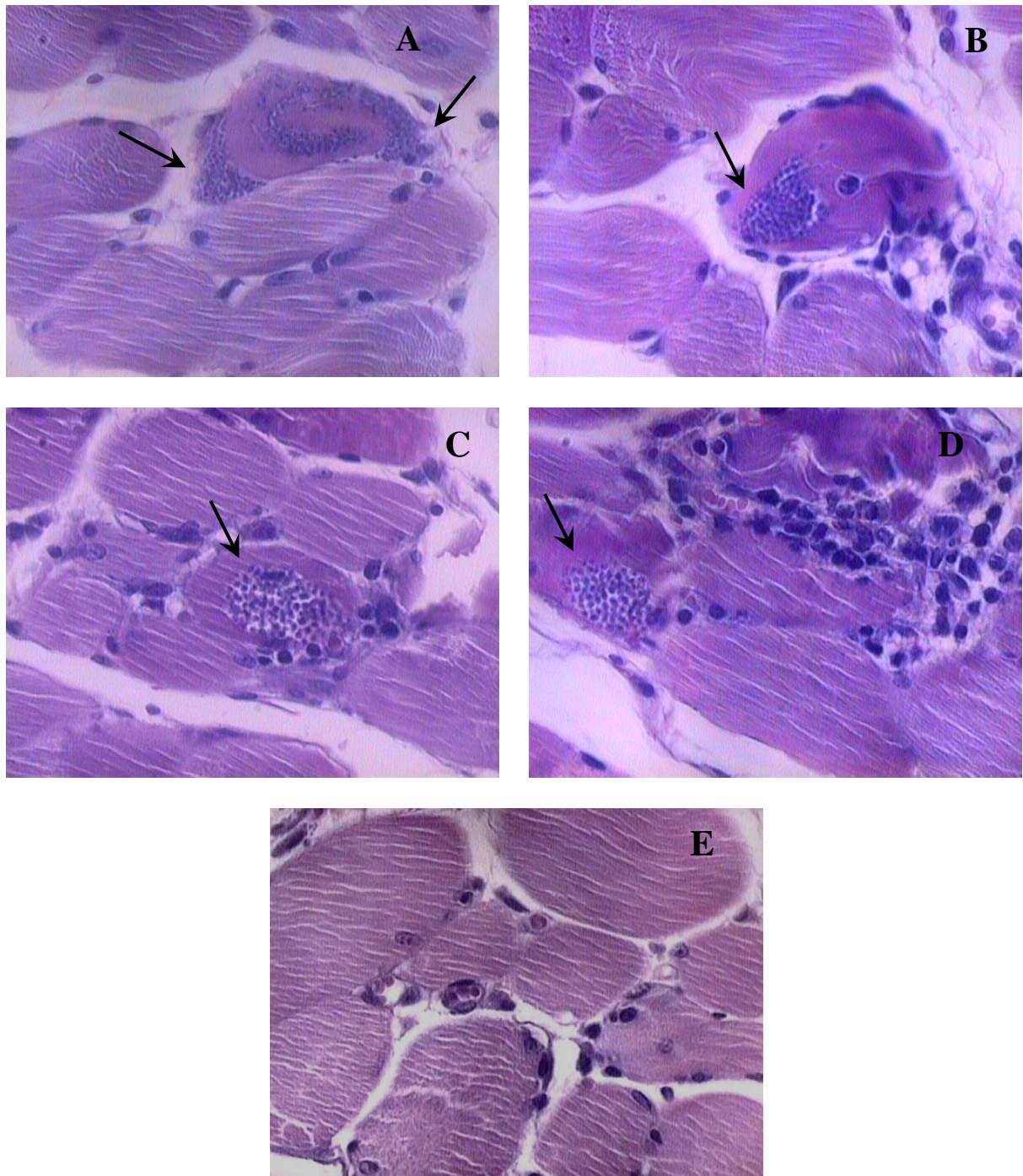


Figura 18. Micrografías representativas de cortes de músculo esquelético que muestran los nidos de amastigotes presentes en este tejido en ratones infectados con la cepa NINOA de *T. cruzi*. Las flechas señalan los nidos de amastigotes en los cortes de órganos de ratones tratados durante 40 días con dosis de 100 mg/kg/día de (A) Control sin tratamiento (vehículo), (B) NPOx-B, (C) NPOx-Et, (D) Bz, (E)Nf. Aumento de 40X y una ampliación de la cámara de 10X.

4. Discusión

Los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas no son completamente efectivos, es por eso que se ha puesto principal interés en el uso del genoma de este parásito para identificar nuevos blancos farmacológicos y desarrollar tratamientos tanto para la fase aguda como la fase crónica de esta enfermedad. Sin embargo, la ausencia del ensamblaje completo de las secuencias genómicas y la presencia de miles de proteínas putativas de función incierta ha impedido el entendimiento completo de las rutas metabólicas de este parásito (Ferreira *et al.*, 2009).

Aunque los blancos farmacológicos pueden ser polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, sin lugar a dudas más del 50% de éstos han sido como inhibidores de enzimas. Por esta razón, es relevante el estudio de las vías metabólicas y las enzimas que catalizan reacciones en común entre diferentes organismos, conocidas como proteínas conservadas. Las enzimas que catalizan reacciones químicas similares usualmente comparten estructura y son conocidas como enzimas homólogas. Por otro lado, las enzimas análogas, tienen poca o ninguna similitud estructural pero comparten la actividad catalítica y no se encuentran evolutivamente relacionadas. Estas diferencias estructurales son un factor determinante en la selección de enzimas como blancos potencialmente terapéuticos (Capriles *et al.*, 2010).

En virtud de que las enzimas glicolíticas son altamente activas en la forma de tripomastigote sanguíneo que solamente se basa en la glicólisis y en la fosforilación a nivel de sustrato para la generación de energía, las enzimas que participan en esta vía o en su regulación han sido propuestas como blancos bioquímicos para el diseño de fármacos con actividad tripanomicida (Michels *et al.*, 2006). Por lo que recientemente, se ha hecho uso de herramientas bioinformáticas para predecir nuevas proteínas y su función metabólica que han apuntado al estudio de enzimas análogas implicadas en el metabolismo energético en vías como la glicólisis, la vía de las pentosas fosfato, el ciclo de Krebs y el metabolismo de lípidos, para

desarrollar nuevos blancos farmacológicos para el desarrollo de tratamientos apropiados para la enfermedad de Chagas (Ferreira *et al.*, 2009).

De acuerdo con lo anterior, se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron derivados del ácido oxámico como: el ácido N-propil oxámico (NPOx) como posible inhibidores de la α -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II (α -HADH) de *T. cruzi* (Chena *et al.*, 2005).

Sobre esta enzima es importante mencionar que a pesar de que el genoma de *T. cruzi* ya ha sido completamente secuenciado (El-Sayed *et al.*, 2005) aun no se ha reportado el gen que codifica para la α -HADH o alguna de sus subunidades, sin embargo, se cree que pertenece a la familia de las malato deshidrogenasas que ya han sido completamente descritas. Dentro de ésta familia se encuentran enzimas análogas a esta como la α -hidroxiácido deshidrogenasa aromática (Nowicki y Cazzulo, 2007). que ha sido ampliamente caracterizada y probablemente derivados aromáticos del ácido oxámico podrían tener efecto inhibitorio sobre esta enzima (Cazzulo *et al.*, 1999). Asimismo, utilizando herramientas bioinformáticas y comparando con la homología estructural de proteínas putativas utilizando el genoma de *T. cruzi*, con la estructura de proteínas obtenidas del proteoma humano se ha reportado la presencia de genes que codifican para la subunidad alfa de una enzima denominada oxo-isovalerato deshidrogenasa en *T. cruzi* (Capriles *et al.*, 2010). Esta enzima, en humanos lleva a cabo la conversión catalítica de alfa cetoácidos a acil-CoA y CO₂ (Aevansson *et al.*, 2000)

Para desarrollar estos inhibidores tomamos en cuenta, no solo la similitud estructural existente entre las amidas N-sustituidas (NPOx) y uno de los dos mejores sustratos de la α -HADH, el α -cetocaproato, sino que además estos oxamatos N-sustituidos se diseñaron también con la idea de interrumpir el mecanismo de reacción de la α -HADH ya que estas sustancias al ser amidas sustituidas presentan resonancia entre dos de sus formas moleculares lo cual impediría la reoxidación del NADH en el sitio activo de la α -HADH. Este tipo de inhibidores se les conoce como inhibidores enzimáticos dirigidos al sitio activo ya que por la similitud estructural del oxamato N-sustituido con el ácidos α -cetocaproico y uno de los mejores sustratos de la α -HADH de *T. cruzi*, presentará afinidad por el sitio activo de esta enzima y una vez unido al

sitio activo por efecto de la resonancia impedirá la reoxidación del NADH con lo cual se tendrá un mejor efecto inhibitor. Estas sustancias demostraron ser excelentes inhibidores competitivos y selectivos de la α -HADH de *T. cruzi* (Chena *et al.*, 2005), pero no mostraron ningún efecto tripanomicida. Se supuso, que la polaridad de estas sustancias les impedía penetrar al interior del parásito. Para reducir esta polaridad, se sintetizaron los ésteres bencílico y etílico del NPOx (NPOx-B y NPOx-Et respectivamente), con los cuales si se obtuvo la actividad tripanomicida esperada (Chena *et al.*, 2005; Aguirre, 2006). Esto se debe a que dichos compuestos por ser sustancias no polares (hidrofóbicas) penetran con mayor facilidad al interior de *T. cruzi* y su eficiente hidrólisis dentro del parásito, genera el NPOx, el cual inhibirá la α -HADH de *T. cruzi* y el metabolismo energético de este parásito, con una consecuente disminución de la motilidad y sobrevivencia de *T. cruzi* (Chena *et al.*, 2005; Aguirre, 2006,). Estos experimentos demostraron que éstos ésteres actúan de hecho como profármacos. Un profármaco es un acarreador inactivo de un fármaco que requiere un paso de activación metabólica antes de exhibir su efecto farmacológico. Esto puede reducir la toxicidad, aumentar el índice terapéutico, aumentar la absorción, disminuir la eliminación e incluso aumentar la selectividad hacia la célula blanco. La búsqueda de compuestos que puedan servir como profármacos para el tratamiento de tripanosomiasis ha sido ampliamente sustentada, ya que, de hecho, el Nf y Bz necesitan sufrir una transformación dentro del parásito para ejercer su efecto farmacológico (Chung *et al.*, 2008).

Resultados previos muestran claramente que la elección de la α -HADH de *T. cruzi* como blanco bioquímico para tratar de obtener sustancias con actividad tripanomicida fue acertada, ya que tanto el NPOx-B como el NPOx-Et, actuando como profármacos mostraron muy buenos efectos tripanomicidas, tanto en epimastigotes en cultivo como en tripomastigotes sanguíneos *in vitro* (Aguirre *et al.*, 2007), éstos últimos responsables de las lesiones irreversibles producidas principalmente en el corazón, las cuales conducen a la muerte de los pacientes. El efecto tripanomicida que se presentó fue considerablemente mayor con el NPOx-B y NPOx-Et que con los fármacos de referencia Nf y Bz. Y al comparar los resultados obtenidos con los dos derivados del ácido oxámico se presentó un mayor efecto con el NPOx-B que con el NPOx-Et, debido probablemente a que el NPOx-B es más

hidrofóbico y atraviesa más fácilmente las membranas plasmáticas. Aunada a la hidrofobicidad nosotros suponíamos que la presencia del alcohol bencílico producto de la hidrólisis del NPOx-B por las esterasas intracelulares de *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005; Gene ID: 36483622) podría incrementar la actividad tripanomicida, para lo cual se determinó por separado el efecto tripanomicida *in vitro* sobre cultivos de epimastigotes de la cepa NINOA e INC-5. A pesar de que esta ampliamente documentado el efecto desinfectante (bactericida, fungicida e insecticida) del alcohol bencílico (FDA), no existen reportes del efecto tripanomicida de este compuesto. Sin embargo, se sabe que los compuestos aromáticos presentan una gran actividad antimicrobiana y actividad tripanomicida *in vitro* sobre cultivos de epimastigotes y tripomastigotes sanguíneos (Franca *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos sobre el efecto tripanomicida del alcohol bencílico en este trabajo (Gráficas 4 y 5), nos indican que efectivamente este compuesto presenta actividad tripanomicida a las concentraciones evaluadas (2, 4 y 8 mM). Al ser comparados éstos resultados, con los obtenidos anteriormente para el efecto tripanomicida del NPOx-B donde a estas concentraciones prácticamente había un efecto tripanomicida mayor al 98% (Aguirre, 2006) permiten indicar que el alcohol bencílico produce un efecto sinérgico al efecto tripanomicida de este derivado del ácido oxámico en la cepas NINOA (Gráfica 6) e INC-5 de *T. cruzi* (Gráfica 7). A diferencia del alcohol etílico que es producto de la hidrólisis del NPOx-Et, el cual no presenta efecto tripanomicida sobre epimastigotes de *T. cruzi* hasta una concentración del 5% (800 mM) (Sülsen *et al.*, 2006). Esto último pone de manifiesto que el NPOx-B estaría actuando como un profármaco acarreador de dos agentes tripanomicidas: el NPOx (inhibidor del metabolismo energético) y al alcohol bencílico.

Partiendo del hecho de que al inhibir la α -HADH se está inhibiendo el metabolismo energético de *T. cruzi*, debido a que esta enzima está estrechamente vinculada con la reoxidación del NAD^+ y la obtención de ATP, en este trabajo se pretende demostrar que el efecto tripanomicida observado con el NPOx-B y NPOx-Et en epimastigotes de *T. cruzi* (Aguirre, 2006) es consecuencia de la disminución del metabolismo energético de *T. cruzi* midiendo las concentraciones intracelulares de ATP y NAD^+ en epimastigotes tratados con el NPOx-B y NPOx-Et. Los resultados obtenidos indican que estos compuestos disminuyen significativamente tanto la

cantidad de ATP como la concentración de NAD^+ , en ambas cepas de *T. cruzi* probadas (NINOA e INC-5), lo que demuestra que la actividad tripanomicida de estos compuestos efectivamente está relacionada con la obtención de energía de este parásito. Esta correlación puede observarse con mayor claridad en las gráficas 6 y 7, que muestran la relación lineal entre la viabilidad y el ATP y en las gráficas 10 y 11 que relacionan la viabilidad contra el NAD^+ para las cepas NINOA e INC-5 de *T. cruzi* en donde al correlacionar gráficamente el porcentaje de viabilidad de los epimastigotes de cada cepa contra el porcentaje de NAD^+ los coeficientes de correlación lineal obtenidos (R^2) fueron prácticamente de 0.9 o mayores. Este coeficiente nos permite estimar estadísticamente si efectivamente existe una correlación entre dos variables, entre más cercano a 1.0 sea este valor indica que existe una mayor correlación entre estas variables y es ampliamente utilizado cuando se quiere conocer si existe correlación entre dos variables en sistemas biológicos (Castro *et al.*, 2010).

En segundo lugar, en este trabajo, se pretende demostrar si el NPOx-B presenta efecto tripanomicida *in vivo* y además si el NPOx-B por ser mas hidrofóbico presenta un mayor efecto tripanomicida que el NPOx-Et, sin dejar de tomar en cuenta toxicidad de estos compuestos tanto *in vitro* como *in vivo* ya que no se debe olvidar que una de las desventajas de los fármacos actualmente disponibles es su gran toxicidad (Oliveira *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la toxicidad del NPOx-Et y el NPOx-B tanto *in vitro* como *in vivo* son compuestos prácticamente no tóxicos. Ya que de acuerdo la clasificación de las sustancias tóxicas un compuesto que presenta una DL_{50} mayor a 2 g/kg de peso por vía oral, es considerada como ligeramente tóxicas (Loomis y Hayes, 1996).

Como ya se ha mencionado anteriormente en este trabajo, una de las grandes desventajas de los fármacos actualmente usados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas es que únicamente son efectivos durante la fase aguda de la enfermedad que se caracteriza por parasitemias altas, incluso uno de los marcadores de la efectividad del tratamiento es la disminución en la cantidad de tripomastigotes circulantes, pero no son efectivos durante la fase crónica de la

enfermedad, que se caracteriza por parasitemias bajas no detectables (Croft *et al.*, 2005). Por lo que uno de objetivos principales de esta línea de investigación es la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos para esta enfermedad que presenten actividad tanto en la disminución de la parasitemia como en la presencia de nidos de amastigotes. Una de las estrategias utilizadas es desarrollar y sintetizar compuestos hidrofóbicos que puedan atravesar la membrana plasmática del parásito y de las células de los tejidos que albergan los nidos de amastigotes. Como ya se mencionó en la introducción, aunque *Trypanosoma cruzi* puede invadir prácticamente todos los tejidos tiene preferencia por músculo cardíaco y con la finalidad de comparar los resultados obtenidos en este trabajo con resultados previos, se buscaron los nidos de amastigotes también en músculo esquelético. Por esta razón este trabajo se evaluó en la actividad *in vivo* del NPOx-B para ser comparado con el NPO-Et y con los fármacos Nf y Bz tanto sobre la parasitemia como sobre la presencia de nidos de amastigotes como se ha propuesto por la iniciativa de desarrollo de fármacos para la enfermedad de Chagas (Romanha *et al.*, 2010).

En cuanto a los resultados *in vivo*, tras la administración de una sola dosis de NPOx-B en el máximo de la parasitemia de ratones infectados con *T. cruzi*, este compuesto mostró, un mejor efecto sobre la disminución de la parasitemia que el NPOx-Et, Nf y Bz en la cepa NINOA y un mejor efecto que el NPOx-Et y Bz sobre la cepa INC-5. Estos resultados correlacionan con los resultados *in vitro* obtenidos anteriormente (Aguirre *et al.*, 2007).

Por otro lado, cuando los compuestos se administraron a una dosis más baja (100 mg/kg/día) durante un periodo más prolongado (40 días), los resultados mostraron que los cuatro compuestos evaluados tanto los fármacos de referencia como los derivados del ácido oxámico, disminuyeron significativamente la parasitemia y provocaron que el día del máximo de ésta se presente antes que el control. Los fármacos de referencia Nf y Bz presentaron el mayor efecto sobre la parasitemia en estos ensayos y al comparar, el efecto del NPOx-B con el NPOx-Et, el derivado bencílico del ácido oxámico presento un mayor efecto sobre la disminución de la

parasitemia que el derivado etílico. Este comportamiento fue similar en ambas cepas de *T. cruzi* evaluadas.

En cuanto a la presencia de nidos de amastigotes tanto en músculo esquelético como en músculo cardíaco, los resultados concuerdan con las curvas de parasitemia obtenidas bajo tratamiento. Tanto los fármacos de referencia como los derivados del ácido oxámico disminuyen significativamente el número de nidos de amastigotes presentes en ambos tejidos. Asimismo, el NPOx-B presenta mayor efecto sobre la disminución de nidos de amastigotes que el NPOx-Et en músculo cardíaco para ambas cepas. En el caso del músculo esquelético el efecto fue contrario, el tratamiento con NPO-Et produjo una disminución mayor en el número de nidos de amastigotes en comparación con el NPOx-B. Mientras que el Nifurtimox redujo el número de nidos de amastigotes casi en su totalidad en ambos tejidos de ratones infectados con cada cepa de *T. cruzi* evaluadas. Estos resultados son similares a los obtenidos en trabajos anteriores en donde se evaluaron los ésteres etílicos del ácido N-propil oxámico y N-isopropil oxámico (Aguirre *et al.*, 2010).

Como ya se mencionó tanto *in vitro* como *in vivo*, el NPOx-B presentó un mayor efecto tripanomicida al ser comparado con el NPOx-Et tanto sobre el metabolismo energético de *T. cruzi* como sobre la parasitemia y los nidos de amastigotes; esto puede deberse al hecho de que el NPOx-B es un compuesto más hidrofóbico que el NPOx-Et lo cual puede estar influyendo en la actividad tripanomicida debido a que se ha reportado que el efecto tripanomicida de algunos compuestos se ve potenciado cuando se adicionan sustituyentes más hidrofóbicos a su estructura química (Vera-Divaio *et al.*, 2009). Este aumento en la actividad tripanomicida de estos profármacos se debe a que son más permeables a las membranas y por tanto, penetran más fácilmente al interior de *T. cruzi* y de las células del huésped. Por otro lado, se ha visto que los sustituyentes aromáticos aumentan de manera significativa la actividad tripanomicida de algunos compuestos, en donde se relaciona el coeficiente de partición octanol/agua (*Log P*) con la capacidad de difundir a través de la membrana (Rodenko *et al.*, 2007). De igual modo, se ha reportado para *T. brucei* cuyo ciclo de vida al igual que *T. cruzi* involucra el paso hacia una forma sanguínea móvil en el huésped mamífero lo que requiere una membrana plasmática altamente

dinámica para los cuales se han utilizado péptidos hidrofóbicos como agentes tripanomicidas (Harrington *et al.*, 2010). Sobre este tripanosomátido se han probado análogos de podofilotoxina cuya potencia tripanomicida se encontró directamente relacionado con sus valores de *Log P* (Uddin *et al.*, 2010).

Por último y aunque para que estos compuestos puedan utilizarse como fármacos para el tratamiento de esta enfermedad faltan un sinúmero de pruebas por hacer, los resultados presentados en este trabajo sugieren que el NPOx-B podría tener un buen efecto tripanomicida tanto en la fase aguda, como en la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Para poder confirmar esto último, unos de los pasos posteriores debería ser entonces probar la eficacia de estos compuestos en un modelo de la fase crónica de la enfermedad de Chagas, el cual ha sido propuesto por varios autores como ratones que comiencen a ser tratados a los 120 días post-infección (Gupta y Garg, 2010). Aunado a esto los derivados del ácido oxámico resultaron poco tóxicos, lo cual les confiere otra ventaja más sobre los fármacos utilizados actualmente para el tratamiento de esta enfermedad (Nf y Bz).

8. CONCLUSIONES.

- i. El alcohol bencílico presentó actividad tripanomicida *in vitro* a en epimastigotes de las cepas NINOA e INC-5 de *T. cruzi*.
- ii. La cantidad de NPOx-B en el sobrenadantes de epimastigotes de la cepa NINOA de *T. cruzi* disminuyó con respecto al tiempo.
- iii. Los compuestos evaluados, NPOx-B y NPOx-Et, presentaron actividad tripanomicida *in vivo* sobre el estadio extracelular (tripomastigote sanguíneo) en el modelo murino a corto plazo (una sola dosis) y a largo plazo (dosis consecutivas durante 40 días)
- iv. La actividad sobre la reducción en la parasitemia cuando el tratamiento fue de una sola dosis de 500 mg/kg (corto plazo) del NPOx-B fue mayor en comparación con el NPOx-Et y los fármacos de referencia Nf y Bz en la cepa NINOA. Efecto semejante en la cepa INC-5, a excepción del Nf el cual registró mayor actividad parasiticida.
- v. Dosis diarias de 100 mg/kg/ durante 40 días (largo plazo) los fármacos de referencia Nf y Bz presentaron la mayor actividad tripanomicida.
- vi. El NPOx-B y el NPOx-Et disminuyen significativamente la cantidad de ATP y NAD^+ en epimastigotes de la cepas NINOA e INC-5 de *T. cruzi*, en donde el NPOx-B origina mayor disminución en comparación con el NPOx-Et. Ésto demuestra claramente que estos compuestos inhiben el metabolismo energético de *T. cruzi*.
- vii. Es probable que la mayor hidrofobicidad del NPOx-B (más hidrofóbico) y el NPOx-Et, favorezca a la disminución del metabolismo energético y consecuentemente un mayor efecto tripanomicida.

- viii. Las DL_{50} por vía oral del NPOx-Et y NPOx-B son mayores a 2 g/kg por lo que no son sustancias tóxicas.
- ix. Tanto el NPOx-B como el NPOx-Et presentaron efecto tripanomicida a corto y a largo plazo y sobre metabolismo energético de *T. cruzi*.
- x. En general el NPOx-B presentó un mayor efecto tripanomicida tanto *in vitro* como *in vivo* (parasitemia y nidos de amastigotes), lo puede estar relacionado con que el NPOx-B es mas hidrofóbico que el NPOx-Et y por tanto es más permeable tanto a la membrana plasmática del parásito como de la célula huésped y a la presencia del alcohol bencílico (tripanomicida) producto de la hidrólisis del NPOx-B.
- xi. El NPOx-B y el NPOx-Et tienen como ventaja ser poco tóxicos a diferencia de los fármacos de referencia, Nifurtimox y Benznidazol.

9. PERSPECTIVAS

Como perspectivas a este trabajo se tienen:

- Evaluar la toxicidad crónica del NPOx-Et y del NPOx-B.
- Determinar el efecto de estos derivados del ácido N-propil oxámico en un modelo de fase crónica de la enfermedad de Chagas.
- Determinar experimentalmente el coeficiente de partición octanol/agua del NPOx-Et y del NPOx-B.
- Establecer una metodología que permita demostrar la permeabilidad de éstos compuestos a la membrana de *Trypanosoma cruzi*.
- Realizar la caracterización estructural y genómica de la -HADH de *T. cruzi*

10. REFERENCIAS Y DIRECCIONES ELECTRÓNICAS

- Alejandro R., Noguera B., Cortés M., Jurberg J., Galvao C., Carcavallo R. (1999).** *Triatoma bassolsae* sp. n. do México com uma chave para as espécies do complexo "phyllosoma" (Hemiptera, Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **94(3)**: 353-359.
- Aguirre C., Zaragoza F., Rodríguez L., Téllez J.L., Noguera B., Baeza I., Wong C. 2010.** Trypanocidal activity of the ethyl esters of N-propyl and N-isopropyl oxamates on intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* acute infected mice. J Enzyme Inhib Med Chem. **25(1)**:111-5.
- Aguirre C., Zaragoza F., Rodríguez L., Noguera B., Baeza I., Wong C. 2007.** *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of the ethyl esters of N-allyl and N-propyl oxamates using different *Trypanosoma cruzi* strains. J Enzyme Inhib Med Chem. **22(2)**:227-33.
- Aguirre A. Ch. 2006.** Síntesis y estudio del éster bencílico del ácido N-propil oxámico como posible agente tripanomicida. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. ENCB-IPN.
- Attaran A. 2006** Chagas' disease in Mexico. Lancet **368(9549)**: 1768-1769.
- Apt Werner. 2010.** Current and developed therapeutic agents in the treatment of Chagas' disease. Drug Des. Devel. Ther. **24 (4)**: 243-253.
- Aevarsson A., Chuang L., Wynn M., Turley S., Chuang T., Hol W.G.J. 2000.** Crystal structure of human branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase and the molecular basis of multienzyme complex deficiency in maple syrup urine disease. Structure **8**:277-291.
- Bakker M., Westerhoff V., Opperdoes R., Michaels M. 2000.** Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. Mol Biochem Pharmacol. **106**:1-10.
- Barcan A. Luna C. 2005.** Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a non reactive recipient of Chagas' disease. Liver Transp. **11(9)**:1112-1116.
- Barbabosa A., Albiter H., Ochoa L., Burgos E., Heydeck S., Velásquez V., Fajardo C., González S., Montes De Oca R., Barbosa M., Guzmán C., Estrada J., Garg N. and Vázquez J. 2009.** *Trypanosoma cruzi* Circulating in

the Southern Region of the State of Mexico(Zumpahuacan) Are Pathogenic: A Dog Model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **81**(3) 390–395

Bazán P., Lo Presti M., Rivarola H., Triquell M., Fretes R., Fernández A., Enders J., Paglini P. 2008. Chemotherapy of chronic indeterminate Chagas disease: a novel approach to treatment *Parasitol Res.* **103**:663–669.

Becerril A., Rangel E., Palafox J., Gómez Juan., Gutiérrez A. 2007 human infection and risk of transmission of Chagas disease in hidalgo state, México *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **76**(2):318–323

Beucher M, Norris KA. 2008. Sequence diversity of the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein family. *Infect Immun.***76**(2):750-8.

Berriman M., Ghedin E., Hertz-Fowler C, et al. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science.* **309**:416–22.

Bisaggio D., Adade C., Souto-Padrón T. 2008. In vitro effects of suramin on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents.* **31**(3):282-6.

Bringaud F., Rivière L., Coustou V. 2006. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation available carbon sources. *Mol. Biochem. Parasit.***149**:1-9.

Calvo M.L.,Noguera B., Alejandro R. (1992). La vía oral. Puerta de entrada de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Lat. Microb.* **34**(4): 39-42.

Capps L, Begoña Abad. 2004 Chagas cardiomyopathy and serologic testing in a small rural hospital in Chiapas, Mexico. *Rev Panam Salud Pública.* **15**: 337–40.

Capriles P., Guimaraes a., Otto T., Miranda A., Dardenne L. and Degraeve W. 2010. Structural Modelling and Comparative Analysis of Homologous, Analogous and Specific Proteins from *Trypanosoma cruzi* versus *Homo sapiens*: Putative Drug Targets for Chagas' Disease Treatment. *BMC Genom.* **11**:610-631.

Castro-Perez JM, Previs SF, McLaren DG, Shah V, Herath K, Bhat G, Johns DG, Wang SP, Mitnaul L, Jensen K, Vreeken R, Hankemeier T, Roddy TP, Hubbard BK. 2010. In-vivo D2O labeling in C57Bl/6 mice to quantify static and dynamic changes in cholesterol and cholesterol esters by high resolution LC mass-spectrometry. *J Lipid Res.* [Epub ahead of print].

Cazzulo F., Vernal J., Cazzulo J., and Nowicki C. 1999. The NAD-linked aromatic α -hydroxy acid dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. A new member of the

cytosolic malate dehydrogenases group without malate dehydrogenase activity. Eur. J. Biochem. **266**: 903-910.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention Actualizado el 21 de septiembre de 2004. <http://www.cdc.gov>.

CENAVECE Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de enfermedades de la Secretaria de salud. 2008. Boletín Número 42 Volumen 25 Semana 42 Del 12 al 18 de octubre de 2008

Chena M.A, Elizondo S., Rodríguez L., Noguera B, Baeza I., Wong C. 2005. Trypanocidal activity of N-isopropyl oxamate on cultured epimastigotes and murine trypanosomiasis using different *Trypanosoma cruzi* strains. J. of Enzyme Inhib Med. Chem **20**(2):189-197.

Chizuka T., Yoshiro I., Mayu S., Hiroyuki M., Shino T., Yusaku N., Yusuke T. Takeshi S., Kazuhito A., Takahashi, and Hayao T. 2003. Conversion of *Lactobacillus pentosus* D-Lactate Dehydrogenase to a D-Hydroxyisocaproate Dehydrogenase through a Single Amino Acid Replacement. J. Bacter. **185**(16). 5023–5026.

Chung M., Ferreira E., Santos J., Giarolla J, Rando D., Almeida A., Bosquesi P., Farina R., Blau L. 2008. Prodrugs for the Treatment of Neglected Diseases. Molecules. **13**: 616-670.

Coronel C., Roval L., Gerez de Burgos N., Burgos C., Blanco A. 1981. Properties of α -hydroxyacid dehydrogenase isozymes from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. **4**:29-38.

Cruz R. A., Pickering L.M. 2005. Presentación de la base de datos “CHAGMEX® 1928-2004”, sobre la Enfermedad de Chagas en México, con un enfoque biológico, geográfico y socioeconómico. 1-16.

Coura JR. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. **102** (1):113-22.

Croft S., Barrett M. and Urbina J. 2005. Review Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis Trends Parasitol. **21**: 508-513

Cymering C, Cazzulo JJ, Cannata JJ. 1995. Phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and physicochemical and kinetic properties. Mol. Biochem. Parasitol. **73**(1-2):91-101.