



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE PRODUCTOS NATURALES  
CON ACTIVIDAD TRIPANOCIDA.”**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área de Química Biológica.

**Lic. María Catalina Güida**

Director de tesis: Mirtha M. Flawiá  
Director asistente: M. Cristina Paveto

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología  
Molecular (INGEBI)

Buenos Aires, 2006

## “CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD TRIPANOCIDA”

### RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una parasitosis endémica en América Latina causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Hasta el momento no se han hallado vacunas ni drogas efectivas para su prevención y tratamiento. Dentro de las estrategias de búsqueda y desarrollo de fármacos, los productos naturales son una fuente de moléculas activas contra diferentes enfermedades.

En nuestro laboratorio se ensayó el efecto del extracto acuoso del té verde de *Camellia sinensis* sobre la forma de tripomastigote sanguíneo del parásito.

Por medio de este ensayo biológico se guió la purificación e identificación de compuestos tripanocidas del té verde utilizando extracciones con solventes orgánicos y técnicas cromatográficas.

Los compuestos caracterizados son catequinas, polifenoles pertenecientes a la familia de los flavan-3-ol, ampliamente estudiadas por sus actividades biológicas y farmacológicas.

Las catequinas fueron efectivas a concentraciones del orden de pM sobre tripomastigotes sanguíneos, siendo las más activas la galato de galocatequina (GCg) y la galato de epigalocatequina (EGCg), con valores de IC<sub>50</sub> de 0.12 y 0.53 pM respectivamente.

La administración de 0.8 mg/kg/día de EGCg vía intraperitoneal durante 45 días a un grupo de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, disminuyó la parasitemia y aumentó la supervivencia de éstos con respecto al grupo control.

La fragmentación oligosomal del ADN de epimastigotes de cultivo luego de la incubación con EGCg, indica que el mecanismo de acción tripanocida de esta catequina estaría dado por la inducción de muerte celular programada.

Las bajas concentraciones a las cuales estas moléculas fueron activas *in vitro*, y los resultados de uno de los experimentos *in vivo*, confieren a las catequinas la posibilidad de ser efectivas en la quimioterapia de la enfermedad de Chagas a concentraciones no tóxicas para el hospedador.

## **PALABRAS CLAVES**

Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, catequinas, galato de epigallocatequina, apoptosis.

## **“BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF NATURAL PRODUCTS WITH TRYPANOCIDAL ACTIVITY”**

### **ABSTRACT**

Chaga's disease is endemic in Latin America and it is caused by the protozoan flagellate *Trypanosoma cruzi*. No vaccines and effective drugs have yet been found to satisfactory prevention and treatment.

Natural products are a continue source of active molecules suitable for the search and development of new drugs against different diseases.

In our laboratory the aqueous extract of *Camellia sinensis* green tea was successfully proved against the trypomastigote stage of parasite.

Purification and identification of active compounds of green tea leaves were carried out through the bioguided assay with blood trypomastigotes using an extraction procedure with organic solvents and chromatographic techniques.

The active compounds were characterized as catechins, polyphenols that belong to the flavan-3-ol group, and their biological and pharmacological properties have been widely studied.

Gallocatechin gallate (GCg) and epigallocatechin gallate (EGCg) were the most active compounds against blood trypomastigotes with IC<sub>50</sub> values of 0.12 and 0.53 pM respectively.

Intraperitoneal administration of 0.8 mg/kg/day of EGCg for 45 days to BALB/c infected mice with *T. cruzi*, diminished the parasitemia and increased mice survival when compared to control.

EGCg induced oligosomal fragmentation of DNA from culture epimastigotes, suggesting that these compounds could exert their trypanocidal action through programmed cell death.

The fact that EGCg is active at very low concentration *in vitro* and the result obtained in one of the *in vivo* experiments *in vivo*, make it suitable to be used in chemotherapy of Chaga's disease without toxicity in the mammalian host.

## **KEY WORDS**

Chaga's disease, *Trypanosoma cruzi*, green tea, epigallocatechin gallate, chemotherapy.

**Algunos de los resultados presentados en esta tesis forman parte de la siguiente publicación:**

Paveto C, Güida MC, Esteva MI, Martino V, Coussio J, Flawiá MM and Torres HN. **2004.** Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Green Tea (*Camellia sinensis*) Catechins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (1);69-74.

Y constan en una solicitud de patente publicada por CONICET.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONICET, por la beca otorgada para la realización del Doctorado.

A la Dra. Mirtha Flawiá, por haberme brindado la posibilidad de comenzar mi formación científica en su laboratorio y poder realizar esta Tesis Doctoral, y al Dr. Héctor Torres por haberme permitido trabajar en el INGEBI, y confiar en el desarrollo de este tema.

A la Dra. Ma. Cristina Paveto, a quien agradezco la manera profesional y sobre todo humana con la que logró dirigirme día a día, y por la alegría y la entrega con que lo hizo.

A la Dra. Mónica Esteva, quien estuvo permanentemente involucrada en este trabajo, por su responsabilidad e interés brindado en cada experimento.

A la Dra. Virginia Martino; quien nos guió en la química de compuestos naturales. A María Teresa, por su labor técnica. Y a Valeria Sülsen, por lo aprendido en el trabajo conjunto

A mis compañeros del 209: Ale, Briardo, Buiyi, Cristian, Guille, Silvia, Pato; y a los que una vez formaron parte del laboratorio, porque con ellos y de ellos también aprendí.

A la Dra. Silvia Matsumoto, por los días compartidos en el INGEBI, y haberme permitido participar en su proyecto.

Al resto de compañeros del INGEBI, por los materiales compartidos y la ayuda brindada.

A los miembros de la secretaría del INGEBI, por su disponibilidad e interés en facilitar las tareas académicas.

A Mari, Francisco, Leo y Gladys, por el constante esfuerzo en proporcionarnos el material de cada día.

A la Dra. Ma. Teresa Téllez-Iñón, por su interés y aportes en este trabajo.

Al Dr Adolfo Iribarren, por la disposición y ocupación en mis consultas.

Al Dr. Leonardo Erijman, por facilitar el uso del microscopio de fluorescencia y a los integrantes del laboratorio por la ayuda técnica en el uso del mismo.

A Laura Belauzarán, por brindarme su ayuda y tiempo en los ensayos de infección con la misma dedicación con que realiza sus propios experimentos.

A Adriana Confalonieri, por lograr la caracterización de las catequinas con una gran calidad profesional y docente.

A la Dra. Alejandra Camino, por su trabajo en los preparados y análisis histopatológicos y el cariño transmitido hacia nuestro laboratorio.

A Leticia y María del Carmen por su invaluable ayuda técnica.

A Cristina Maidana y Marta Lauricella por proporcionarnos cultivos de epimastigotes cada vez que los requerimos.

A la Dra. Laura Fichera, por la experiencia transmitida en los experimentos de cultivo y la libertad con que me permitió trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Miriam Postan, por las cuidadosas extracciones de macrófagos cada vez que lo necesitamos, por su interés y las críticas constructivas hacia el trabajo.

A Ceci Albareda, por haber hecho amenos los días largos de trabajo en el INP.

A Violeta (IBYME), por ser la extraccionista oficial de suero.

Al Dr. Hugo Cerecetto, la Dra. Mercedes González y los miembros de su laboratorio. Por su hospitalidad y labor en el curso que me permitió profundizar y ampliar los conocimientos en mi tema de trabajo.

Al Dr. Rafel Radi y miembros de su departamento. Por la calidad del material y trabajo brindado en el curso que ofrecieron, el cual fue de suma importancia y utilidad en el desarrollo de esta Tesis.

A los docentes y alumnos de Microbiología y Virología con los que compartí la experiencia de ayudante, y me ayudaron en técnicas de éste trabajo.

A los amigos que compartieron mi interés y esfuerzo para doctorarme.

A toda mi familia, por el cariño y ayuda incondicionalmente recibida en el transcurso de esta etapa. A mi mamá, de quien siempre necesité sostén emocional, por habérmelo dado en toda ocasión.

A la familia Martínez, por su cariño y por hacerme sentir bienvenida.

A Ferna, por su amor, compañía y contención. Por acompañarme en este proyecto y el esfuerzo con que me ayudó a poder concretarlo.



## **ABREVIATURAS**

**Abs:** Absorbancia

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADP:** Adenosin difosfato

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNasa:** Ribonucleasa

**ATP:** Adenosin trifosfato

**BSA:** Seroalbúmina bovina

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DTT:** Ditiotreitól

**EDTA:** Ácido Etilén Diamino Tetra Acético

**FICT:** Fluoresceína-12 UTP

**IC<sub>50</sub>:** Concentración mínima que inhibe el 50 %

**IC<sub>90</sub>:** Concentración mínima que inhibe el 90 %

**kADN:** Ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto

**Kb:** Kilopares de bases

**NAD:** Nicotinamida adenina dinucleotido

**nm:** Nanometros

**pb:** Pares de bases

**PBS:** Buffer fosfato salino

**PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsufonilo

**poliA:** Oligonucleotido de adenina

**Rf:** Relación de frente

**SD:** Desvío estándar

**Tris:** Tris (hidroximetil) aminometano

**UTP:** Uridin trifosfato

**UV:** Ultravioleta

**INTRODUCCION**

1- DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE DROGAS:	
UNA PERSPECTIVA HISTÓRICA	2
1.1- La evolución del desarrollo de drogas	2
1.2- Identificación y validación de blancos	4
1.3- Drogas derivadas de productos naturales	5
2- LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	6
2.1- Consideraciones generales	6
2.2- Fases de la enfermedad	10
2.3- Diagnóstico	12
2.3.1- <i>Diagnóstico serológico</i>	12
2.3.2- <i>Diagnóstico parasitológico</i>	12
2.4- Evaluación de la cura	13
3- EL PARASITO	14
3.1- Clasificación	14
3.2- Estadios evolutivos del parásito	16
3.3- Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
3.4- Biología celular del <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
4- CONTROL DE LA ENFERMEDAD	22
4.1- Actividades de Control	22
4.2- Estrategias de Control	22
4.2.1- <i>Control vectorial</i>	22
4.2.2- <i>Control transfusional</i>	23
4.3- Logros de los procedimientos de Control	23
5. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA ARGENTINA	24
6- QUIMIOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	25
6.1- Tratamientos	25
6.2- Perspectivas y dificultades del actual desarrollo de drogas	27
6.2.1- <i>El metabolismo de la glucosa y el glicosoma</i>	28
6.2.2- <i>Caminos de las pentosas fosfato</i>	29
6.2.3- <i>Metabolismo de tioles</i>	29
6.2.4- <i>Metabolismo de poliaminas</i>	30
6.2.5- <i>Síntesis de ADN</i>	31
6.2.6- <i>Topoisomerasas de ADN</i>	31
6.2.7- <i>Transcripción</i>	32
6.2.8- <i>Metabolismo de lípidos</i>	33
6.2.9- <i>Degradación de proteínas</i>	38
6.2.10- <i>Proteínas de membrana, transportadores e incorporación de drogas</i>	40
6.2.11- <i>Metabolismo del acidocalcisoma</i>	41
6.2.12- <i>Metabolismo de aminoácidos</i>	42
6.2.13- <i>Muerte celular programada</i>	43
6.3- Drogas ensayadas experimentalmente entre 1992/1993 -2002	44

7- <i>Camellia sinensis</i>	46
7.1- Clasificación	46
7.2- Procesos de producción de tes	47
7.3- Componentes del té verde	47
7.4- Estructura química de las catequinas	48
7.5- Extracción, purificación e identificación de las catequinas	50
7.6- Propiedades físico- químicas de las catequinas	51
7.7- Propiedades biológicas y farmacológicas de las catequinas	51
7.8- Farmacocinética de las catequinas	53
8- ANTECEDENTES DEL LABORATORIO	55
9- OBJETIVOS DE TRABAJO	57

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

1- Reactivos	59
2- Aparatos y equipos	59
3- Material vegetal	60
4- Extractos y fracciones	60
5- Preparación de catequizas	60
6- Parásitos	60
6.1- <i>Epimastigotes</i>	60
6.2- <i>Tripomastigotes sanguíneos</i>	60
6.3- <i>Tripomastigotes de cultivo</i>	61
7- Recuento de células	61
8- Animales	61
9- Cultivos Celulares	62
9.1- <i>Línea de cultivo de células Vero</i>	62
9.2- <i>Cultivo primario de macrófagos murinos</i>	62
9.3- <i>Fijación y Tinción de células</i>	62
9.4- <i>Recuento de células infectadas</i>	63
10- Determinación de proteínas	63
11- Extracción del material vegetal	63
12- Fraccionamiento bioguiado de los extractos activos del té verde de <i>Camellia sinensis</i>	63
13- Sub-Fraccionamiento de la F5	64
14- Análisis de los componentes de las fracciones de la cromatografía en columna	64
15- Caracterización de catequinas	64
16- Actividad tripanocida en ensayos <i>in vitro</i>	65
16.1- <i>Ensayo sobre tripomastigotes sanguíneos</i>	65
16.2- <i>Ensayos sobre amastigote</i>	65
16.2.1- <i>Inhibición de la infección</i>	65
16.2.1.A- <i>Línea celular Vero</i>	65
16.2.1.B- <i>Cultivo primario de macrófagos</i>	66
16.2.2 <i>Ensayos de inhibición de la replicación</i>	66
16.3- <i>Determinación de óxido nítrico en cultivo primario de macrófagos</i>	67
16.4- <i>Inhibición del crecimiento de Epimastigotes</i>	68

17- Ensayo de citotoxicidad de la EGCg <i>in vitro</i>	68
18- Ensayo de citotoxicidad de la EGCg <i>in vivo</i>	69
19- Actividad tripanocida en ensayos <i>in vivo</i>	69
20- Estudios histopatológicos	70
21- Análisis estadístico	70
22- Ensayos de actividad de quinasa de arginina	71
23- Microscopía electrónica de tripomastigotes sanguíneos	71
23.1- <i>Obtención de tripomastigotes sanguíneos</i>	71
23.2- <i>Incubación de tripomastigotes sanguíneos con EGCg</i>	72
24- Muerte celular programada	72
24.1- <i>Observación de fluorescencia de extremos OH 3'</i> de ADN fragmentado	72
24.2- <i>Fragmentación oligosomal del DNA</i>	74
25- Medios, buffers y soluciones generales	75

## **RESULTADOS**

1- IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD TRIPANOCIDA A PARTIR DEL EXTRACTO ACUOSO DEL TÉ VERDE	81
1.1- Fraccionamiento del extracto acuoso del té verde de <i>C. sinensis</i>	81
1.1.1- <i>Actividad tripanocida de extractos de té verde de</i> <i>C. sinensis</i>	82
1.2- Sub-fraccionamiento de F5 por cromatografía en columna	83
1.2.1- <i>Actividad tripanocida de las fracciones obtenidas de la</i> <i>columna de LH-20</i>	83
1.2.2- <i>Cromatografía en capa delgada de las fracciones de la F5</i>	84
1.3- Caracterización de catequinas en la fracción F 16-40	85
1.3.1- Actividad tripanocida de las catequinas comerciales	86
2- CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DE LAS CATEQUINAS	88
2.A- Ensayos <i>in vitro</i>	88
2.A.1- Determinación de la IC <sub>50</sub> sobre tripomastigotes sanguíneos	88
2.A.2- Toxicidad de la EGCg sobre células Vero	89
2.A.3- Análisis de la actividad tripanocida sobre amastigotes	90
2.A.3.1- Infección y replicación en cultivos de células Vero	90
2.A.3.2- <i>Infección y replicación en cultivos primario de macrófago</i> <i>Efecto sobre la producción de nitritos</i>	91
2.B - Ensayos <i>in vivo</i>	92
2.B.1- Ensayos de toxicidad de la EGCg en modelo murino	92
2.B.2- Ensayos de actividad tripanocida de la EGCg y Polifenón 60 en modelo murino	93
2.B.2.1- <i>Administración vía intraperitoneal</i>	93
2.B.2.2- <i>Administración vía oral</i>	97

2.B.3- Evaluación de la toxicidad en los ensayos de actividad tripanocida de la EGCg y Polifenón 60 en modelo murino	98
<b>3- MECANISMO DE ACCION</b>	<b>99</b>
3.1- Actividad quinasa de arginina	99
3.2 - Microscopía electrónica de tripomastigotes sanguíneos	100
3.3- Análisis de la actividad tripanocida sobre epimastigotes	101
3.4- Muerte celular programada	103
3.4.1 <i>Observación de fluorescencia de extremos OH 3' de ADN fragmentado</i>	103
3.4.2- <i>Análisis de la fragmentación oligosomal del ADN</i>	103
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>107</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>109</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO</b>	<b>129</b>

# *Introducción*

## **1- DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE DROGAS: UNA PERSPECTIVA HISTÓRICA**

### **1.1- La evolución del desarrollo de drogas**

La investigación para el desarrollo de drogas con perspectivas de industrialización comenzó hace apenas un siglo. La misma se estableció como una relación interdisciplinaria, dado que los avances en el conocimiento de la **química** permitieron su aplicación en otros campos, y a que la **farmacología** se la definió como una disciplina científica.

El estudio de la química de los colorantes, potenciado por la formulación de la teoría del benceno, dio lugar al nacimiento de la **quimioterapia**. La afinidad selectiva de los colorantes por los tejidos biológicos permitió a Paul Ehrlich postular la existencia de “quimiorreceptores”. Él, posteriormente, argumentó que ciertos quimiorreceptores de parásitos, microorganismos y células cancerosas, podrían ser diferentes de las estructuras análogas en los tejidos del huésped, y que estas diferencias podrían ser explotadas terapéuticamente. Este tipo particular de terapia con drogas, posibilitó un triunfo terapéutico sin precedentes en el curso del siglo XX.

La **química analítica**, a través del aislamiento y purificación de ingredientes activos de plantas medicinales realizó también un aporte decisivo a la medicina ya en el siglo XIX. Dado que los ingredientes activos de las plantas comenzaban a estar disponibles, las farmacias suministraban preparaciones estandarizadas de estas drogas aún impuras.

Como consecuencia del descubrimiento de la penicilina y de otros antibióticos, la **microbiología** señaló un hito en el desarrollo de drogas y quimioterapia. La **bioquímica** influenció la investigación introduciendo nada menos que el concepto de enzimas y receptores, lo cual empíricamente, resultó en la definición bioquímica de blancos o moléculas blanco de acción para drogas.

La farmacología reformuló el concepto de receptor con un criterio funcional, en el cual los describe como macromoléculas que reciben y generan señales

específicas, y que pueden ser bloqueados por antagonistas o estimulados por agonistas.

Al erigirse la **biología molecular** como una rama independiente de la bioquímica surgió el concepto de gen y el desarrollo de herramientas para su manipulación, lo cual abrió una nueva perspectiva en el descubrimiento de drogas. Reside en ella el potencial para comprender procesos patológicos a nivel genético-molecular, y determinar los blancos moleculares óptimos para nuevos compuestos. Así fue que en los años '80 se crea la tecnología del ADN recombinante.

La **química combinatorial**, los avances en el estudio de la **biología estructural**, más específicamente la resonancia magnética nuclear, la cristalización robótica, la cristalografía de rayos X y computadoras de alta velocidad, han facilitado la determinación de las estructuras de las proteínas. Los avances tecnológicos han propulsado a la biología estructural hasta una posición donde la elucidación de una estructura tridimensional de proteínas relevantes en el uso médico fuera posible en gran escala.

En 1998, los productos biotecnológicos, la mayoría de ellos proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales, llegaron a ser el 26.3% de las drogas introducidas en el mercado mundial.

De todos modos, ninguna de las instituciones que han afrontado los esfuerzos iniciales (farmacias, laboratorios de universidades, ó las compañías de productos colorantes) representaron plataformas convenientes para la investigación en drogas guiada por la química, pero ahora controlada por la farmacología, la clínica y la biología molecular. Se crearon nuevas instituciones que afrontaron la investigación y desarrollo interdisciplinario de drogas. Una nueva forma de encontrar, caracterizar y desarrollar agentes terapéuticos permitió el nacimiento de una nueva industria (Drews J, 2000).



## **1.2- Identificación y validación de blancos**

La **genómica**, la **secuenciación rápida del ADN**, los ensayos sobre **células en cultivo** y la búsqueda automatizada en gran escala (**HTS**, high-throughput screening), le otorgaron al descubrimiento de drogas una nueva dimensión. A partir de entonces hipotéticos blancos moleculares pueden involucrarse en un gran número en ensayos y ser expuestos a una amplia gama de compuestos.

A pesar de las expectativas creadas por la posibilidad de realizar el ensayo de compuestos en gran escala, las 50 compañías líderes de la industria farmacéutica no mejoraron su productividad durante los 1990s. La falta de resultados significativos puede deberse a dos razones: una biológica y la otra química. El hecho de que las moléculas propuestas como blancos puedan estar asociadas a ciertas enfermedades, no significa que ellas representen niveles de intervención posibles para las nuevas drogas.

Los blancos moleculares necesitan **validación**, proceso por el cual se define el rol del blanco hipotético en el fenotipo de la enfermedad. La credibilidad del mismo depende de la complejidad y relevancia del modelo de la enfermedad en el cual el blanco es evaluado.

Hay varios niveles de validación de un blanco:

- a)** El menor nivel de validación está constituido por cambios fenotípicos dosis-dependientes y reproducibles en cultivos celulares.
- b)** La credibilidad aumenta en modelos con animales, en el cual las modificaciones del blanco permiten las modificaciones fenotípicas deseadas.
- c)** El mayor nivel de validación recae en demostrar que la modificación de un blanco, por ej., el bloqueo de un receptor, ó la inhibición de una enzima, producen la reversión de los síntomas de la enfermedad en una situación clínica.

La definición genética y el análisis funcional de muchos cientos de blancos de drogas incluirán, inevitablemente, la descripción de varios alelos del blanco encontrado en diferentes poblaciones humanas. Esos isogenes son la causa más probable de variaciones en la respuesta a drogas. Hay pocos ejemplos notables en los cuales el polimorfismo de genes blanco influencia la respuesta de la droga (el adrenoreceptor  $\beta_2$  para albuterol, ó la proteína CETP para

provastatín). De todos modos, la selección de drogas tendrá que recaer sobre datos epidemiológicos. Los factores económicos condicionarán el uso de tales datos, no sólo como claves para una terapia individualizada, sino -y tal vez más importante- para la identificación de aquellos blancos que aumentarán la posibilidad de tratamiento de una enfermedad en particular (Drews J, 2000).

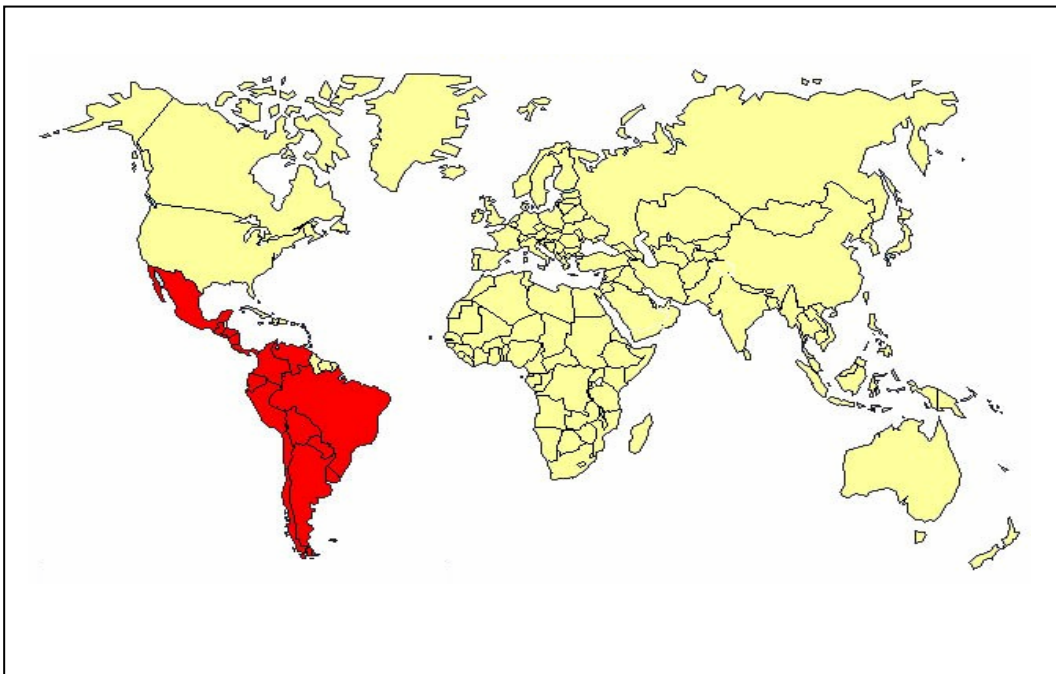
### **1.3- Drogas derivadas de productos naturales**

Los productos naturales representan entre un 25% y un 50% de los fármacos hoy en uso. Pese a los avances obtenidos en el desarrollo de técnicas moleculares, ocurrió un movimiento denominando “vuelta a la naturaleza”. Esta tendencia fue acentuada por los éxitos obtenidos, por ejemplo con el taxol en la quimioterapia del cáncer, y la artemisina para malaria. Tal intensificación en la búsqueda de drogas a partir de compuestos naturales se observó también en tripanosomiasis y leishmaniasis. Muchos artículos recientes describen la investigación de la actividad tripanocida de una amplia variedad de extractos naturales crudos, especialmente vegetales, compuestos aislados y análogos semi-sintéticos. Ante la reaparición de la fitoterapia, se hizo necesario un grupo multidisciplinario con experiencia en botánica, química, bioquímica, biología molecular y celular y farmacología (Coura JR y Castro SA, 2002; Kayser O y col., 2003).

## 2- LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

### 2.1- Consideraciones generales

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una zoonosis crónica que existe sólo en el Continente Americano (**Figura 1**). Fue descubierta por Carlos Chagas en 1909, y está causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* cuyo complejo ciclo de vida involucra vertebrados e insectos (WHO A).



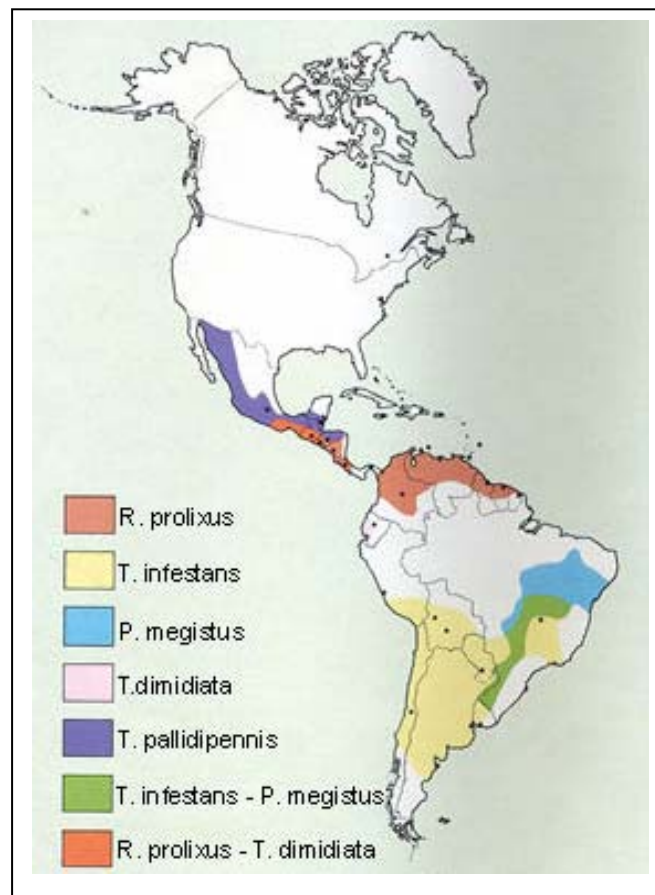
**Figura 1:** Mapa de la distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas. ■ Países endémicos para la enfermedad (WHO B).

Existen varias formas de transmisión de esta enfermedad en humanos: a través de la transmisión vectorial, por transfusión sanguínea, por transplante de órganos, por transmisión congénita y por accidentes del laboratorio (Dias JCP y Schofield CJ, 1999; Moncayo A, 2003; TDR, 2005).

La **transmisión vectorial** es la más frecuente en zonas endémicas, la cual se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta la provincia de Chubut en el sur de Argentina. A pesar de que todas las especies de insectos pertenecientes al

## Introducción

orden *Triatominae* pueden ser potenciales vectores de *T. cruzi*, sólo *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylu megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma rubrofasciata* y *Triatoma sordida* son epidemiológicamente importantes. *Triatoma infestans* es el principal vector de la enfermedad de Chagas en Argentina, Brasil, Chile, Uruguay, Paraguay, Perú Bolivia y Ecuador, en cambio la distribución de *P. megistus* está más restringida al territorio brasilero. En México, Guatemala, Honduras, El Salvador y Nicaragua, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* son, epidemiológicamente, las especies más importantes (**Figura 2**) (Silber AM y col., 2005; WHO D). La enfermedad aparece como resultado de la invasión humana a los ecotopos naturales y el consecuente establecimiento de insectos vectores en las viviendas de baja calidad de construcción (Urbina JA y Docampo R, 2003; TDR, 2005). Por tal motivo esta parasitosis es una enfermedad en la que se conjugan factores bioecológicos y socioeconómicos (Urbina JA, 2002).



**Figura 2:** Mapa de distribución de las especies más frecuentes de vinchucas, vectores del *T. cruzi*, en América latina (Carlomagno M y col., 1989).

En las décadas de 1970 y 1980, las migraciones desde los centros rurales hacia las áreas urbanas cambiaron el tradicional patrón epidemiológico de la enfermedad de Chagas en América Latina: de condición exclusiva de áreas rurales se transformó en una infección urbana que puede transmitirse también por **transfusión sanguínea** (Moncayo A, 2003). El riesgo de infección, definido como la probabilidad de ser infectado cuando se recibe una unidad de transfusión infectada, ha sido estimada en el 20 % para *T. cruzi* según el área geográfica, varía desde 0.1- 4.2 % en Argentina, Brasil, Chile y Uruguay, y puede ser mayor al 24,4% en Bolivia (TDR, 2005). La falta de insumos en los bancos de sangre respecto de prevenir la dispersión de la enfermedad, asociada a la inexperiencia en el diagnóstico, hizo de la transfusión sanguínea la vía de transmisión más probable de la enfermedad en áreas urbanas. Recientemente, la creciente emigración de personas infectadas con *T. cruzi* a los Estados Unidos, llevó consigo esta forma de transmisión del parásito. Así, el mapa de distribución de la enfermedad, se extiende ahora, desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina (Urbina JA, 2002; Urbina JA y Docampo R, 2003).

Aunque la **transmisión congénita** es numéricamente pequeña, es la tercer forma de transmisión en importancia. La prevalencia de la infección por *T. cruzi* en mujeres embarazadas en América Latina es entre el 2% y el 51% en áreas urbanas y el 23% al 81% en áreas rurales (Schijman AG y col., 2003). Más del 4% de los nacimientos de madres infectadas pueden resultar en niños infectados debido a que el parásito puede atravesar la placenta sugiriendo que parte de las nuevas infecciones que se producen por año pueden deberse a ésta ruta de transmisión (Dias JCP y Schofield CJ, 1999).

Desafortunadamente, la transmisión congénita no puede ser prevenida durante el embarazo debido a que las drogas disponibles son tóxicas o teratogénicas, por lo que el mejor tratamiento consiste en el pronto diagnóstico del recién nacido seguido del tratamiento correspondiente.

La transmisión de *T. cruzi*, también puede ocurrir a través del **transplante de órganos** de un donante infectado a un receptor susceptible. Teóricamente puede resultar del transplante de cualquier órgano, pero la mayoría de los casos documentados son el resultado de trasplantes de riñón, con unos pocos casos atribuidos a transplante de corazón, páncreas y médula ósea.

En áreas endémicas es obligatorio el control serológico del donante y el receptor. El tratamiento de este último también es aplicado cuando está infectado y el donante es sano, ya que es posible la reactivación de la enfermedad por el uso de inmunosupresores durante la operación.

De todas formas en casos urgentes de transplante debería igualmente procederse y la mejor estrategia de control es un tratamiento específico del dador infectado durante 10 días antes y un tratamiento similar en el receptor un día antes de la operación y durante 9 días posteriores. El objetivo es minimizar los parásitos circulantes en el dador para inhibir su establecimiento en el receptor.

La **transmisión accidental** de *T. cruzi* es frecuente en laboratorios y se han documentado más de 50 casos, generalmente como resultado de incisiones accidentales con agujas con sangre infectada o salpicado con heces de triatomíneos infectadas o material de cultivo.

Este problema se puede prevenir otorgando un buen entrenamiento al personal y manteniendo una rigurosa atención a los procedimientos de laboratorio.

En los casos de accidente donde la persona tenga posibilidades de haberse infectado con *T. cruzi*, se le debe aplicar tratamiento quimioterapéutico, por lo que se recomienda que las drogas se encuentren disponibles en todos los centros de investigación (Dias JCP y Schofield CJ, 1999).

A pesar que se estima que la incidencia de nuevos casos de la enfermedad de Chagas, disminuyó desde 700.000-800.000 a 200.000 en los países del cono sur (Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay) (**Figura 3**), la misma es un problema serio para la Salud Pública. Hay aproximadamente 16-18 millones de personas infectadas en América Latina y 40 millones en riesgo de infectarse. No existe una inmunidad adquirida esterilizante, ni vacunas, ni drogas efectivas (Barrett MP. y col., 2003). La mortalidad y morbilidad asociada con esta enfermedad, son un orden de magnitud mayor a las causadas por otras parasitosis como malaria, esquistosomiasis o leishmaniasis: hay 21.000 muertes por año, representa la primera causa de lesiones cardíacas en jóvenes adultos económicamente productivos y las pérdidas económicas consiguientes, están calculadas en US\$ 6.5 mil millones anuales en los países endémicos (Urbina JA y Docampo R, 2003; Moncayo A, 2003; TDR, 2005).

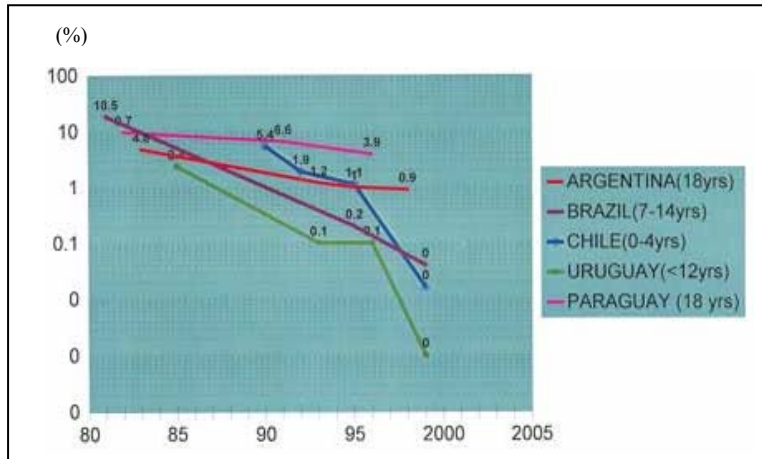


Figura 3: Eliminación de la transmisión: Incidencia e infección 1980-2000 (WHO c)

## 2.2- Fases de la enfermedad

La enfermedad de Chagas evoluciona en distintas fases; éstas varían de un individuo a otro, y algunas son potencialmente fatales.

La primera es la **fase aguda** de la enfermedad y está causada por el proceso de amplificación del parásito dentro de las células del huésped mamífero.

Comienza casi inmediatamente después de la invasión de *T. cruzi* a los distintos tipos celulares donde se desarrolla: macrófagos, fibroblastos, tejido nervioso y muscular. La reacción primera a esta invasión es una inflamación mononuclear local debida a la ruptura de las células parasitadas, lo que posibilita lesiones de diversa severidad.

La fase aguda está caracterizada por una alta parasitemia y presencia de parásitos también en otros tejidos. En pocos días puede detectarse en suero la presencia de complejos inmunes. También se ha observado agregación de plaquetas, desgranulación de eosinófilos, patología microvascular, edema, trombosis (Coura JR y Castro SA, 2002).

Las manifestaciones clínicas del estado agudo comienzan en los 6-10 primeros días luego de la infección, y persisten como máximo 1-2 meses. Frecuentemente, en el sitio de la infección, se produce una inflamación conocida como chagoma, y si está cerca del ojo, se forma una congestión local conocida como signo de Romaña. Esta manifestación es una de las pocas que permite reconocer la infección en el paciente, ya que en la mayoría de los

casos, la fase aguda es asintomática o con signos de malestar leves que son característicos también de otras enfermedades infecciosas.

Pese a esto, existe un índice de mortalidad entre el 2% y 8%, especialmente entre los pacientes inmunosuprimidos y los niños, en los cuales puede desarrollarse una forma más severa de la enfermedad, con trastornos cardíacos y encefalomiелitis (Barrett MP y col, 2003; Urbina JA, 2002; Andrade LO y Andrews NW, 2005).

La **fase crónica** de la enfermedad no es desarrollada necesariamente por todos los pacientes infectados: sólo un 30-40% de las personas infectadas y luego de 10 a 25 días posteriores al momento de la infección cursan esta forma esencialmente frecuente en hombres de entre 20-45 años de edad.

Es ésta una condición debilitante lenta, caracterizada por manifestaciones de órganos dañados, produciéndose aquí las patologías cardíacas, digestivas o nerviosas típicas de la enfermedad de Chagas crónica. Puede causar lesiones irreversibles en el corazón y tracto gastrointestinal (Urbina JA, 2002).

Los síntomas usuales de esta etapa son dolor de pecho, palpitaciones, mareos, y edemas periféricos. También son frecuentes los fenómenos de arritmia cardíaca, tromboembolismo, otras fallas del corazón y muerte súbita. La enfermedad de Chagas también presenta megaviscera, principalmente megaesófago y megacolon con diferente prevalencia según la región geográfica considerada (Barrett MP y col., 2003). Recientemente, una disfunción retinal con consecuentes trastornos visuales nocturnos como falta de adaptación a la oscuridad, se ha incluido en la patogenia de la enfermedad de Chagas crónica (Matsumoto SC y col., 2005).

Clínicamente existe una tercera fase, llamada **fase latente**, ó **subclínica**, ó **indeterminada**. Comienza inmediatamente después del episodio agudo y puede durar un largo período. Los pacientes se vuelven asintomáticos, y recuperan un aparente estado de salud, con hallazgos típicos en los electrocardiogramas y radiografías de tórax dado que no pueden ser demostrados daños viscerales por los métodos estándares. La infección sólo puede ser verificada por estudios serológicos. Cerca del 70-85% continúa en este estado indeterminado de la enfermedad de Chagas crónica por el resto de sus vidas (Moncayo A, 2003, Silber AM y col., 2005).



## **2.3- Diagnóstico**

Además del diagnóstico clínico sintomático, rutinariamente se realizan los diagnósticos serológico y parasitológico.

### *2.3.1- Diagnóstico serológico*

En la fase aguda de la enfermedad se generan anticuerpos IgM, siendo reemplazados por IgG a medida que progresa la infección, los cuales son explorados a través de técnicas serológicas. Las más usadas son hemoaglutinación directa (HAD) e indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el inmunoensayo enzimático (ELISA). IFI y ELISA han demostrado alta sensibilidad y especificidad y pueden estandarizarse como pruebas de rutina. El uso de estos test ha sido tradicionalmente elegido por su simplicidad, bajo costo y buen rendimiento. Un problema asociado con estos métodos es la reactividad cruzada entre *T. cruzi*, *Leishmania ssp.* y *Trypanosoma rangeli*, que genera falsos positivos y reduce la sensibilidad (Andrade J, 2004). Debido a que la especificidad de las pruebas puede variar considerablemente, los límites de positividad deben definirse localmente utilizando un panel de sueros conocidos. Se recomienda el empleo de, al menos, dos pruebas serológicas para confirmar el resultado. Para que haya confiabilidad, las técnicas deben ser apropiadamente normalizadas y se debe establecer un estricto control de calidad. Sobre la base de la experiencia obtenida en varios países, se recomienda la creación de una red de laboratorios nacionales que permita el intercambio continuo de muestras (Barret MP y col., 2003; Luquetti AO y col., 2003). En Argentina, las indicaciones para el control de calidad interno del diagnóstico de Chagas por métodos de laboratorio está descrito en **Control de Calidad del Inmunodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Manuales de Procedimientos. INP (1994 y subsiguientes)**.

### *2.3.2- Diagnóstico Parasitológico*

En casos de sospecha de Chagas agudo se emplean los siguientes métodos ordenados en forma creciente de complejidad y sensibilidad: a- Gota fresca y

gota gruesa, b- Método de Strout, c- Método de capilares, d- Hemocultivo, e- Xenodiagnóstico.

El xenodiagnóstico y el hemocultivo, siguen siendo usados como métodos parasitológicos indirectos clásicos, siendo útiles en la fase crónica de la enfermedad (Coura JR y Castro SA, 2002).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue el mayor avance para el control parasitológico de la enfermedad de Chagas, con positividad entre 2 a 3 veces mayor para casos crónicos cuando se comparó con el xenodiagnóstico o hemocultivo. Por esta técnica es posible detectar un parásito o un fragmento de ADN de *T. cruzi* en 20 ml de sangre (Barrett MP y col, 2003). Se han utilizado diferentes técnicas basadas en la PCR que detectaron tanto ADN nuclear como del kinetoplasto del parásito. Recientemente, Vera-Cruz y col., agregaron un diseño del método de PCR anidada a través del cual indica que los parásitos persisten preferencialmente en el corazón, músculo esquelético y colon; generando una herramienta que podría no solo ser útil en el diagnóstico, sino también en la elucidación de la patogénesis de la enfermedad (Andersson J, 2004).

### **2.4 Evaluación de la cura**

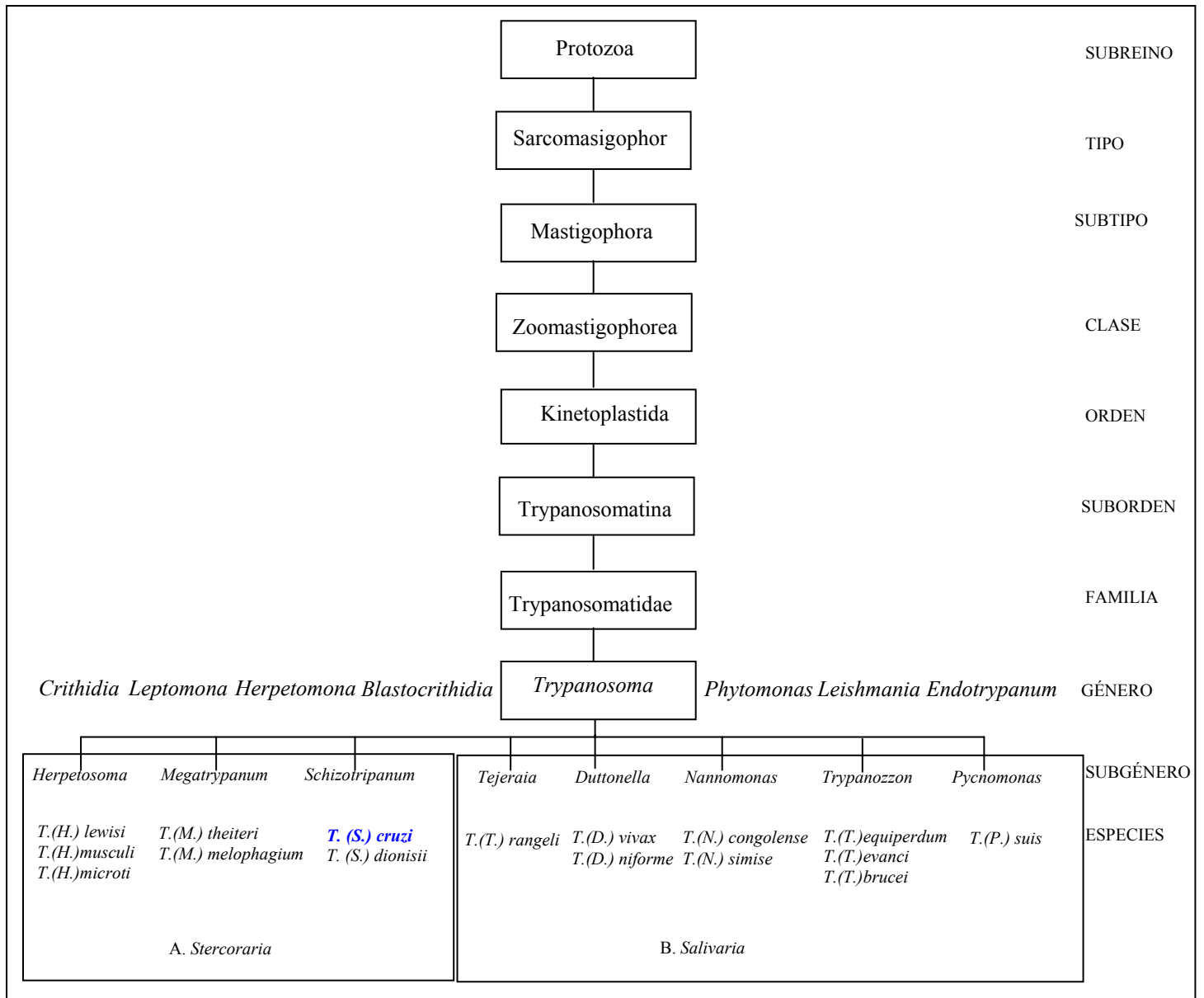
La evaluación de la cura de la enfermedad de Chagas es el aspecto más complejo del tratamiento, dando muchas veces resultados diversos y controvertidos en relación a la cura parasitológica y serológica. El término cura parasitológica por si misma es de difícil interpretación y la evaluación es casi imposible, dado que podría significar la eliminación total del parásito no sólo en sangre sino también en los tejidos. Así, en humanos no es viable que pueda ser confirmado. Por otro lado, la cura clínica es una evaluación a largo término y muchas veces incierta debido a la patogénesis de la enfermedad, la cual involucra la acción del parásito y la respuesta inmune y autoinmune del paciente (Coura JR y Castro SA, 2002).

### **3- EL PARASITO**

#### **3.1- Clasificación**

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo que pertenece al subtipo Mastigophora del tipo Sarcomastigophora; orden Kinetoplastida, compuesto por organismos flagelados con un kinetoplasto (organela que contiene una gran cantidad de ADN). Pertenece al género *Trypanosoma*, que comprende a los parásitos llamados digenéticos porque atraviesan la forma tripomastigote en uno de sus estadios de desarrollo. Este género se divide en dos secciones: *Salivaria* y *Stercoraria* (Hoare, 1966; Maslov DA, 2001). En la primera están comprendidos los tripanosomas patógenos que se multiplican en el mamífero en el estadio tripomastigote, completan su desarrollo en las glándulas salivales del insecto vector y son transmitidos por inoculación, ej. *T. brucei* y *T. congolense* (transmisión anterior). En la segunda se agrupan especies no patógenas a excepción de *T. cruzi*, que se multiplican en el mamífero en forma de amastigote, completan su desarrollo a través de distintos estadios en la parte posterior del insecto vector y son transmitidos desde éste a los huéspedes mamíferos a través de las heces (transmisión posterior).

En esta clasificación existen excepciones: el *Trypanosoma equiperdum* pertenece a la sección *Salivaria* y se transmite directamente de mamífero a mamífero; *Trypanosoma rangeli*, perteneciente a la sección *Stercoraria*, completa su desarrollo en la parte anterior del vector y es transmitido por inoculación. Los tripanosomas que se multiplican en los vertebrados por medio de estadios intracelulares como *T. cruzi* están agrupados en el subgénero *Schizotrypanum*. De ahí que el nombre taxonómico completo sea *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **(Figura 4)**



**Figura 4:** Clasificación taxonómica de los tripanosomátidos.

### **3.2- Estadios evolutivos del parásito**

*T. cruzi* evoluciona durante su ciclo de vida en formas diferentes que son identificadas por la posición relativa del kinetoplasto respecto del núcleo de la célula y la emergencia del flagelo.

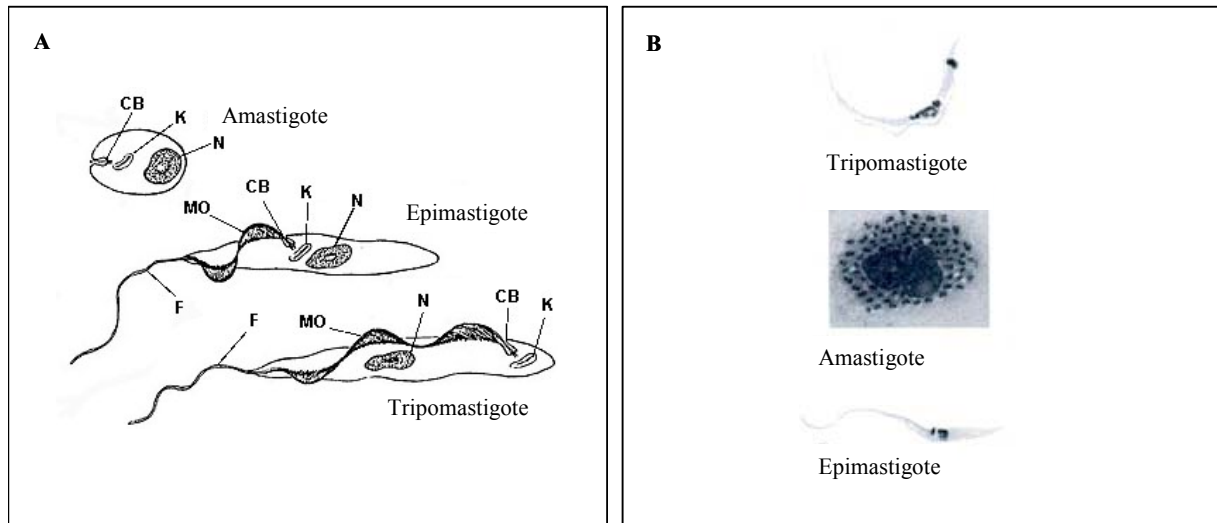
**Amastigote:** es un estadio replicativo que se halla en el citoplasma de las células del hospedador mamífero o en cultivo celular. Pueden infectar otras células de vertebrados y su forma es característicamente esférica u ovalada de 2.4 a 6.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Algunos autores denominan a esta forma **esferomastigote**, forma aflagelada, ó forma leishmanial (De Souza W, 2002). Otros como Tyler y Engman consideran la forma esferomastigote como un estadio temprano de diferenciación a la forma epimastigote (Tyler KM y Engman MD, 2001).

**Epimastigote:** Es una forma extracelular elongada, 20-40 x 2  $\mu\text{m}$ , con el kinetoplasto localizado en la parte anterior al núcleo. Posee un flagelo, el cual emerge por el costado del cuerpo celular y se libera por el extremo anterior, arrastrando la membrana citoplasmática en un trayecto breve. Esta forma es capaz de dividirse y es observada en cultivos axénicos y en el intestino del huésped invertebrado (De Souza W, 2002).

**Tripomastigote:** Esta forma es infectiva y no replicativa. Tiene una longitud de aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  y un diámetro de 2  $\mu\text{m}$ . El kinetoplasto está localizado posterior al núcleo, y el flagelo emerge a partir del mismo, dando lugar a una extensa membrana ondulante. Los tripomastigotes pueden ser observados en: (i) cultivos celulares y sangre del hospedador vertebrado, (ii) en el intestino posterior, en las heces del huésped invertebrado, (iii) en la fase estacionaria de crecimiento de un cultivo axénico, y (iv) en la fase líquida de un cultivo celular (De Souza W, 2002).

Aunque estas formas son fácilmente identificadas, existen formas intermediarias que pueden ser encontradas en los huéspedes vertebrados e invertebrados. El predominio de una forma particular podría deberse

principalmente a las condiciones que rodean al parásito (**Figura 5**) (Silber AM y col., 2005).



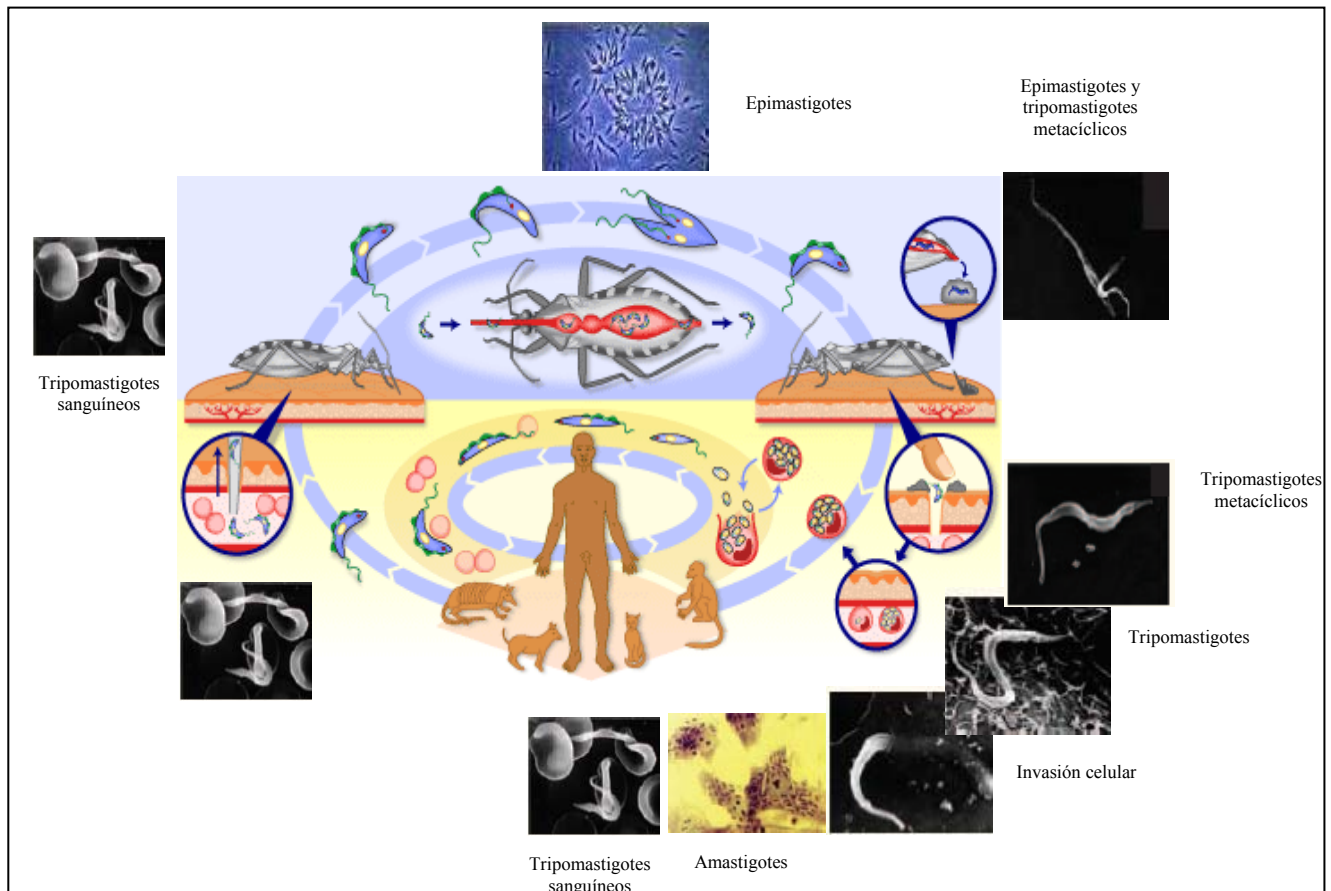
**5:** **A.** Esquema de los principales estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. K: kinetoplasto; CB: cuerpo basal; MO: membrana ondulante; F: Flagelo; N: Núcleo. **B.** Fotografías de las distintas formas de *T. Cruzii* durante su ciclo de vida.

### **3.3- Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***

El ciclo biológico de *T. cruzi* comienza cuando el vector invertebrado, que es un insecto hematófago, se alimenta del huésped vertebrado e ingiere una población pleomórfica de tripomastigotes. Dentro del estómago del insecto, los parásitos se transforman en epimastigotes y algunas formas intermedias redondeadas que son capaces de transformarse tanto en epimastigotes cortos, los que comienzan un proceso de multiplicación en el intestino, ó en epimastigotes largos que se mueven a la región más posterior del tracto digestivo del insecto. Aparentemente, estos epimastigotes largos, son incapaces de dividirse. En el recto, cierta proporción de epimastigotes, se diferencia a tripomastigotes metacíclicos, los cuales durante la alimentación del insecto son eliminados con las heces cerca del sitio de la picadura. El prurito y rascado posterior del hospedador mamífero permite la penetración de los tripomastigotes al torrente sanguíneo, desde donde son capaces de invadir las células de varios tejidos del vertebrado (De Souza W, 2002. Gironés N y col., 2005; Tyler KM y Engman MD, 2001). Recientemente se han descrito

múltiples eventos de transducción de señales desencadenadas por la invasión del parásito en la célula huésped (Wilkowsky SE y col, 2002).

Una vez en la célula la forma metacíclica se escapa de la vacuola endocítica, también conocida como vacuola parasitófora, y se transforman en amastigotes que se dividen repetidamente por fisión binaria. A altas densidades los amastigotes dan lugar a los tripomastigotes a través de formas intermediarias, algunas de las cuales tienen forma de epimastigotes. Las células que son prematuramente lisadas pueden también liberar amastigotes, los cuales son observados en el torrente sanguíneo durante la fase aguda de la infección. Estos amastigotes pueden servir para propagar la infección dado que ellos también son capaces de infectar células, particularmente células fagocíticas, aunque por un mecanismo diferente que los tripomastigotes. Finalmente la mezcla de tripomastigotes y amastigotes presentes en la sangre de un mamífero infectado sirve para completar el ciclo cuando es ingerido por un insecto vector (**Figura 6**) (Tyler KM y Engman MD, 2001; De Souza W, 2002; Andrade LO y Andrews NW, 2005).



**Figura 6:** Ciclo de vida de *T. cruzi*. Modificado de Andrade LO y Andrews NW, 2005; y WHO D

### **3.4- Biología Celular de *T. cruzi***

Los tripanosomátidos contienen organelas que son típicas de la mayoría de los organismos eucarióticos, incluyendo mitocondrias, peroxisomas, lisosomas y retículo endoplasmático, y también han desarrollado muy bien las rutas endocíticas y secretorias. Pero algunas de las organelas de los tripanosomátidos tienen características que son únicas de este grupo (**Figura 7**) (Docampo R y col., 2005).

Desde el punto de vista morfológico, **la superficie celular** de los tripanosomátidos, puede ser considerada compuesta por dos componentes: la *membrana plasmática*, y el *citoesqueleto* (microtúbulos subpelliculares).

En la *membrana plasmática* hay un gran número de proteínas asociadas a través de un anclaje de glicosil fosfatidil inositol (GPI). Recientes estudios han caracterizado en algunos detalles la biosíntesis del anclaje de GPI, el cual involucra varios pasos. Las drogas que inhiben enzimas claves de este camino, constituyen candidatos potenciales para el uso quimioterapéutico. Ej: las drogas que inhiben la proteína farnesil transferasa arrestan el crecimiento de *T. cruzi* (De Souza W, 2002)

El *citoesqueleto* de los tripanosomátidos está básicamente formado por una capa de microtúbulos localizados debajo de la membrana plasmática. Existen pequeños puentes que conectan los microtúbulos unos con otros, a la membrana plasmática y a la cisterna del retículo endoplasmático (De Souza W, 1999). Los nuevos aspectos de los microtúbulos del citoesqueleto de los tripanosomátidos y las características estructurales y de sensibilidad a drogas que presentan las tubulinas de *T. cruzi* con respecto a las del huésped mamífero, hacen de estas estructuras atractivos blancos terapéuticos (Steeverding D y Tyler KM, 2005).

A pesar de que las moléculas y los esteroides están uniformemente distribuidas a través de la membrana plasmática, existen áreas de especialización de la membrana. En el caso de las formas epimastigote y amastigote de los miembros del subgénero *Schizotrypanum* forman una estructura conocida como complejo **citostoma-citofaringe** que es una invaginación de la membrana plasmática especializada en actividades endocíticas. Comienza



cercana a la región nuclear, puede llegar hasta el bolsillo flagelar y formar parte del mismo (De Souza W, 2002).

La membrana que delinea el citostoma, es diferente de las que delimitan otras regiones de la superficie celular. Presenta una superficie rugosa, probablemente debido a la exposición de un gran número de sitios de unión para lectinas, receptores proteicos para varios ligandos, etc. Vesículas endocíticas pequeñas se originan en el citostoma, forman largos túbulos y se fusionan con una organela especial localizada en la porción posterior, conocida como **reservosoma**. Esta organela corresponde a un compartimento pre-lisosomal y se sugiere que su función es el sitio de almacenamiento de macromoléculas ingeridas, las cuales podrían ser usadas durante los procesos de transformación de la forma epimastigote a tripomastigote (De Souza W, 1999).

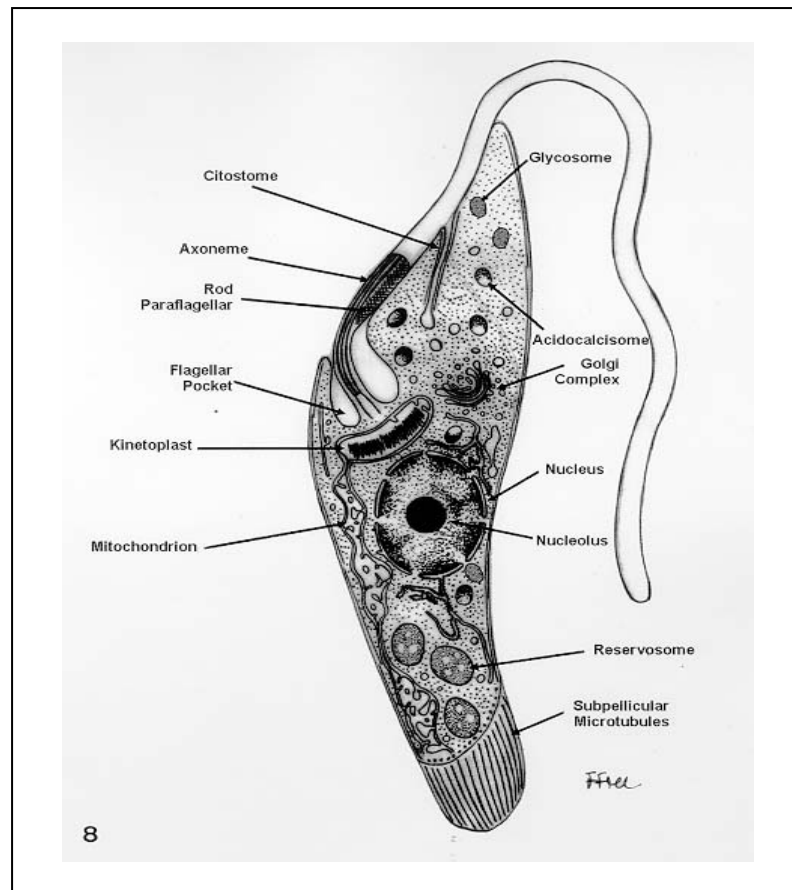
El **flagelo** de los tripanosomátidos está involucrado en al menos dos procesos biológicos: el movimiento de la célula y la unión del protozoo a la superficie de la célula del huésped vertebrado e invertebrado. En *T. cruzi*, como en otros miembros de la familia *Trypanosomatidae*, se encuentra una estructura especial conocida como **estructura paraxial** o **cuerpo paraflagelar**. Está formado por un arreglo complejo de estructuras filamentosas asociadas al **axonema** a través de puentes proteicos en pares de 4 a 7 (De Souza W, 1999).

**El complejo kinetoplasto-mitocondrión** que caracteriza el orden *Kinetoplastida* está presente en *T. cruzi*. Esta organela es única y está localizada en la base del flagelo, contiene una red de ADN (kADN) extranuclear concatenado que codifica para funciones involucradas en la producción de energía, como en las mitocondrias convencionales. El kADN representa alrededor del 30% del ADN total de la célula. Está formado básicamente por una red de minicírculos asociados unos con otros. Cada minicírculo tiene una longitud aproximada de 0.45µm, correspondiente a 1440 pares de bases. También presenta maxicírculos con una longitud de 6 a 11µm de largo comparable al ADN mitocondrial encontrado en células eucariotas (De Souza W, 1999).

**El glicosoma** es una estructura que puede ser redondeada, con un diámetro de 0.3µm, o elongada con una longitud de 2.8µm cuya principal función es la concentración y compartimentalización de las enzimas involucradas en los

caminos glicolíticos, incrementando la eficiencia de estos procesos. En otras células, estas enzimas están localizadas en la matriz citoplasmática (De Souza W, 1999).

**Los acidocalcisomas** son organelas ácidas densas, con una alta concentración de fósforo en forma de pirofosfato y polifosfato acompañado con calcio y otros elementos. El descubrimiento de bombas e intercambiadores en la membrana de los acidocalcisomas sugieren una función metabólica. Los tripanosomátidos fueron los organismos donde primero se describieron estas organelas. Hoy se sabe que están presentes en varios organismos y que han sido conservadas evolutivamente desde bacterias hasta humanos (Docampo R y col., 2005).



**Figura 7:** Esquema de estructuras encontradas en la forma de epimastigote de *T. cruzi* (De Souza W, 1999)

## **4- CONTROL DE LA ENFERMEDAD**

### **4.1- Actividades de Control**

Gracias a exitosas campañas para el control de la transmisión de la enfermedad en Argentina, Brasil, Chile y Venezuela antes de los 1970s, otros países adoptaron medidas similares. Así en 1991, Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay establecieron la **Iniciativa del Cono Sur**. Luego Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela, establecieron en 1997 la **Iniciativa de los Países Andinos**; casi un año después, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México y Nicaragua se unieron para formar la Iniciativa de los **Países de América Central**. La estrategia de control para la eliminación de la enfermedad en estos países, está basada en la interrupción de la transmisión vectorial y en el control sistemático de los dadores de sangre durante el período que va desde 1996 a 2010, como se expresó en una resolución de la Asamblea Mundial de la Salud (Resolución WHA 51.14) (Barret MP y col., 2003, WHO E).

### **4.2- Estrategias de Control**

Los conocimientos disponibles indican que la forma más común de transmisión de *T. cruzi* a humanos puede ser interrumpida por:

#### *4.2.1- Control vectorial*

Consiste en la eliminación del insecto vector por medio de aerosoles insecticidas de efecto residual, pinturas insecticidas, latas fumigantes, mejoramiento de las viviendas y educación sanitaria como parte del desarrollo sostenido de áreas rurales y peri-urbanas. Los insecticidas más usados para la eliminación de triatomíneos son los compuestos organoclorados Dieldrin y gamma-hexaclorociclohexano y los piretroides, que muestran aún más efectividad (Barret MP y col., 2003, WHO E).

*4.2.2- Control Transfusional*

En 10 países de América del Sur y en 3 de América Central se analiza la sangre del 100% de los donadores (TDR, 2005). El objetivo es detectar en la sangre la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi*, y reforzar la infraestructura de los servicios de salud para múltiples controles de sangre (HIV, hepatitis B y *T. cruzi*) (WHO E).

La única sustancia tripanocida actualmente en uso para el tratamiento de la sangre infectada es el cristal violeta, pero su aplicación está limitada debido a sus efectos tóxicos, el alarmante color que aparece en la piel y orina de los pacientes transfundidos, y principalmente porque no es activo sobre todas las cepas del parásito. Se ha sugerido que algunos antioxidantes utilizados frecuentemente en la industria alimentaria, tales como BHT (**butil-hidroxi-tolueno**) y BHA (**butil-hidroxi-anisol**), pueden sustituir convenientemente al cristal violeta en la esterilización de sangre para transfusión.

Recientemente se ha postulado que los productos naturales con baja toxicidad y potentes cualidades antioxidantes podrían ser aún más apropiados que los antioxidantes sintéticos en tanto posean alta actividad tripanocida contra la forma sanguínea infectiva no replicativa de *T. cruzi* (Sepúlveda- Boza S y Cassels BK, 1996).

**4.3- Logros de los procedimientos de control**

El costo-beneficio de las iniciativas de control para la enfermedad de Chagas ha sido altamente positivo según los últimos informes disponibles. La transmisión vectorial de la enfermedad ha sido eliminada en Uruguay (1997) y Chile (1999); y en gran parte en Brasil (2000) y Argentina (2002). Hubo una reducción del 72% de la infección en niños y jóvenes adultos en los países del Cono Sur. El número de infectados en los últimos informes, sugiere que disminuyó la prevalencia de la enfermedad (Barret MP, 2003).

## **5. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA ARGENTINA**

El principal vector es *T. infestans* (**Figura 8**) y el área de transmisión de la enfermedad cubre el 60% del país.

Desde 1999 se ha llevado el control del total del área endémica. Ese control se considera la fase más avanzada del proceso de eliminación. El número promedio de hogares infectados en 1980 era 30%; en 2002 descendió al 1%, lo cual equivale al 98% de reducción en la infestación de hogares por el vector.

La tasa de seroprevalencia en todo el país para el grupo de edades de 0-4 años es 0.9%, lo cual confirma el bajo número de casos agudos entre niños de esas edades. En el grupo de edad de 0-14 años, la tasa es de 1.9%; y el grupo de edad de hombres de 18 años, la tasa de seroprevalencia disminuyó desde 5.8% en 1981 a 0.5% en 2002.

La interrupción de la transmisión vectorial se ha logrado en 10 de las 13 provincias endémicas del país.

Finalmente, se ha logrado controlar en un 100% los bancos de sangre para la enfermedad de Chagas en el sector público y un 80% en los privados (Moncayo A, 2003).

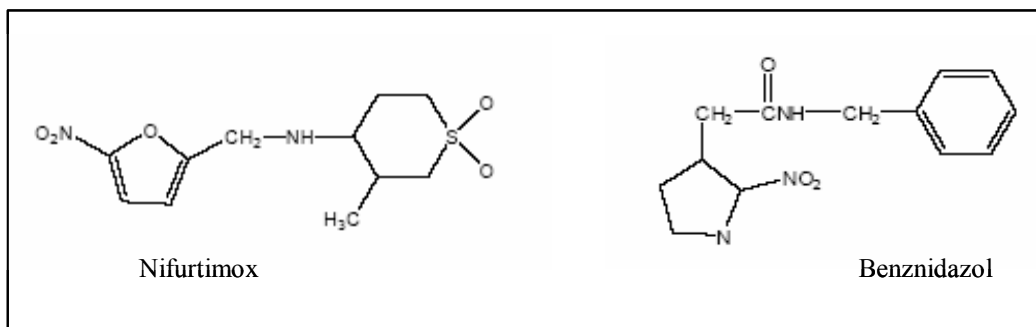


**Figura 8:** *Triatoma infestans*

## 6- QUIMIOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

### 6.1- Tratamientos

Además de las estrategias de prevención de la enfermedad de Chagas ya mencionadas, desde fines de 1960 y el comienzo de los 70s existen dos drogas para el tratamiento de la enfermedad: Nifurtimox (Nfx) y Benznidazol (Bz) (Coura JR y Castro SA, 2002) (**Figura 9**).



**Figura 9:** Estructura química de las drogas actualmente en uso para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Ambas drogas fueron empleadas en estudios clínicos por diferentes investigadores, especialmente en Brasil, Chile y Argentina. Los resultados obtenidos variaron de acuerdo a la fase de la enfermedad, el período del tratamiento y la dosis, la edad y origen geográfico del paciente (Coura JR y Castro SA, 2002). Los dos compuestos son capaces de curar al menos el 50% de las infecciones recientes, son activos sólo en la fase aguda de la enfermedad y en el comienzo de la fase crónica (TDR, 2005). Es importante resaltar también los buenos resultados obtenidos y su utilidad en el tratamiento de casos de infección congénita y accidentes de laboratorio (Coura JR y Castro SA, 2002).

El Nfx, [3-metil-4-(5'-nitrofurfurilendiamino tetra hidro 4H- 1,4- tiamina-1, 1dióxido)], tiene efecto tripanocida sobre la forma sanguínea del parásito y es mejor tolerada en pacientes jóvenes. Actúa a través de la reducción del grupo nitro, formando un nitroanión inestable, el cual reacciona con el oxígeno para producir anión superóxido altamente inestable y peróxido de hidrógeno (Maya

JD y col., 2003). Es sintetizado por Bayer y conocido como Bayer 2502, su manufactura ha sido discontinuada ante la ventaja demostrada en el mercado por Bz aunque la expectativa de una extensión de la licencia para su uso en el tratamiento de la Tripanosomiasis Africana humana, ha implicado que continúe produciéndose (Silber AM y col., 2005; Urbina JA, 2002; Barrett MP, 2003).

El Bz, es un nitroimidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) manufacturado por Roche. En el mercado es conocido como Rochagam (Brasil) y Radanil (Argentina). Su mecanismo de acción, a diferencia del Nfx, no es por daño oxidativo. La acción del Bz parece estar dada por una unión covalente de los metabolitos reducidos del Bz con los componentes moleculares del parásito (Coura JR y Castro SA, 2002; Urbina JA, 2002; Maya JD y col., 2003).

Las limitaciones en el uso de estas drogas, se deben no sólo a la variabilidad de eficacia ya mencionada ó la disponibilidad en el mercado, sino también a la variedad y gravedad de los efectos colaterales que producen ambas.

Los efectos secundarios más frecuentes para el Nfx son: anorexia, pérdida de peso, alteraciones psíquicas, excitabilidad o sueño, y manifestaciones digestivas como náuseas y vómitos. Las reacciones adversas producidas por el Bz incluyen hepatotoxicidad, agranulocitosis iniciada por neutropenia, fiebre y púrpura trombocitopénica, caracterizada por reducción de plaquetas y ruptura de vasos capilares (Coura JR y Castro SA, 2002).

Pese a lo mencionado, la administración de estos compuestos, está indicada en las siguientes situaciones:

- Para la fase aguda y casos congénitos el tratamiento recomendado es 8 a 10 mg/kg/día de Nfx o 5 to 7.5 mg/kg/día de Bz durante 30 to 60 días consecutivamente, y dividido en dos o tres dosis diarias.
- Pacientes con un peso inferior a 40kg pueden ingerir no más de 12 mg/kg/día de Nfx y hasta 7.5 mg/kg/día para Bz durante 30 a 60 días.
- Para la infección crónica reciente (niños menores a los 12 años) o individuos infectados en los últimos 10 años, el tratamiento debería realizarse con 8 mg/kg/día de Nfx o 5 mg/kg/día de Bz durante 30 a 60 días.

- En el caso de infección accidental se debería comenzar el tratamiento inmediatamente y realizarse durante 10 a 15 días consecutivos.
- Infecciones crónicas tardías sin manifestaciones clínicas o con manifestaciones cardíacas ó digestivas suaves, deberían tratarse durante 60 a 90 días, según la tolerancia a la droga a fin de prevenir o reducir la evolución de la enfermedad a formas más severas, un hecho que no está definitivamente probado (Coura JR y Castro SA, 2002).

## **6.2- Perspectivas y dificultades del actual desarrollo de drogas**

Siguiendo los requerimientos de la Organización Mundial de la Salud (WHO), la droga ideal para el tratamiento de la enfermedad de Chagas debería cubrir los siguientes requerimientos:

- Cura parasitológica de los casos agudos y crónicos.
- Efectividad en una o pocas dosis.
- Bajo costo, accesible a los pacientes.
- No producir efectos colaterales o teratogénicos.
- Que el tratamiento no requiera hospitalización.
- Que no induzca resistencia.

Hasta la fecha, la droga ideal para la enfermedad de Chagas no existe y posiblemente lleve un largo tiempo obtenerla. Pero sí se ha invertido y se sigue invirtiendo mucho esfuerzo y tiempo en obtener al menos, una droga efectiva para todos los estadios de la enfermedad y/o con efectos colaterales menos severos que los producidos por las drogas disponibles.

El desarrollo de esta nueva quimioterapia anti-parasitaria podría resultar, como se mencionó anteriormente:

- De la búsqueda de bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales,
- De compuestos con estructuras similares a una droga con actividad reconocida en ensayos con agentes para otras enfermedades ó,
- A través de la determinación de un blanco específico, identificado en un camino metabólico clave. Aunque se presenten muchos blancos posibles es necesaria su validación. El criterio de validación propuesto por Wang, sugiere



que antes de dirigir un gran esfuerzo hacia el diseño de un inhibidor específico, deberían usarse los siguientes abordajes:

- 1- Correlación entre la acción sobre el blanco y la actividad anti-parasitaria entre una serie de derivados de drogas.
- 2- La comparación de la sensibilidad del blanco a la droga vs. la resistencia de los parásitos a la misma.
- 3- La delección de los genes que codifican para los blancos en el parásito (Coura JR y Castro SA, 2002).

Los caminos bioquímicos generales de los tripanosomátidos, pero ausentes en el hospedador humano, han sido largamente considerados como blancos potenciales de drogas. Pero también deben considerarse factores farmacocinéticos intrínsecos al desarrollo biológico de la enfermedad. En la fase crónica de la enfermedad de Chagas, el blanco es la forma amastigote de *T. cruzi*. Con esta consideración, la droga debe entrar a los diferentes tipos de células del hospedador mamífero, lo cual disminuye la cantidad de droga disponible para interactuar con el parásito y aumenta los riesgos de los efectos tóxicos que puede causar en el huésped (Barrett MP y col, 2003).

Los avances en el estudio de la biología estructural y bioquímica básica de *T. cruzi*, ha permitido la identificación de nuevos blancos y el desarrollo racional de nuevos compuestos que nos acerquen a la quimioterapia de la enfermedad. Estos son:

### **6.2.1- El metabolismo de la glucosa y el glicosoma**

*T. cruzi*, como otros organismos kinetoplástidos, obtienen su energía a través de la glicólisis.

En tripanosomátidos, las 6 primeras enzimas de este camino se encuentran en el glicosoma, a diferencia de la mayoría de las células eucariotas donde se encuentran en el citosol.

La gran dependencia de la glicólisis como fuente de energía, y las características estructurales diferenciales de las enzimas respecto de las del huésped hacen a las enzimas glicolíticas blancos atractivos para el diseño de drogas tripanocidas (Oppendoes, FR y Michels PAM, 2001; Barrett MP y col., 2003, Maugeri DA y Cazzulo JJ, 2004).

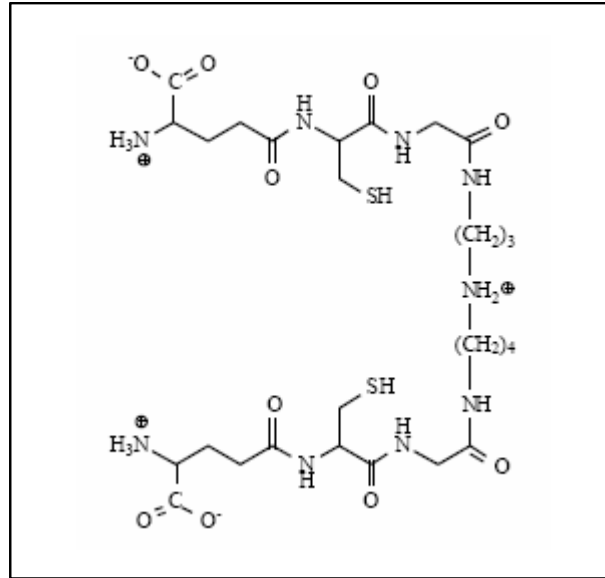
### **6.2.2- Caminos de las pentosas fosfato**

Otro camino importante de la utilización de energía es el de las pentosa fosfato (PPP). Las actividades de PPP son, principalmente la reducción de NADP a NADPH, necesario para las reacciones biosintéticas y la protección de las células ante el estrés oxidativo, y la producción de ribosa-5-fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos (Maugeri DA y Cazzulo JJ, 2004).

En tripanosomas, muchas enzimas del camino de las pentosas fosfato están relacionadas a isoformas presentes en cianobacterias más que en organismos eucariotas. La 6-fosfogluconato deshidrogenasa, es esencial para tripanosomátidos, y se han estudiado las diferencias estructurales a su contraparte en mamíferos, para el diseño de inhibidores específicos (Barrett MP y col., 2003).

### **6.2.3- Metabolismo de tioles**

El rol que en eucariotes superiores cumple el glutatión, en *T. cruzi* es llevado a cabo por el tripanotión [N<sup>1</sup>, N<sup>8</sup>-bis(glutationil)espermidina] (**Figura 10**), el único tiol de bajo peso molecular que consiste en dos moléculas de glutatión unidos por espermidina. Se han presentado evidencias de que la tripanotión reductasa es una enzima esencial en *Leishmania donovani*. La interrupción del gen o la disminución de su expresión en *L. donovani* y *L. major* disminuyeron la capacidad de sobrevivir al estrés oxidativo de amastigotes presentes en macrófagos. Pero la sobreexpresión de esta enzima en *L. donovani* y *T. cruzi* no les alteró la sensibilidad a agentes que inducen estrés oxidativo, tales como nifurtimox, nitrofurazona y violeta de genciana. Así, los inhibidores del metabolismo del tripanotión son potencialmente candidatos ideales para drogas contra *T. cruzi*, sola o en conjunción con drogas productoras de radicales libres como el nifurtimox o el benznidazol (Coura JR y Castro SA, 2002; Barrett MP y col., 2003).

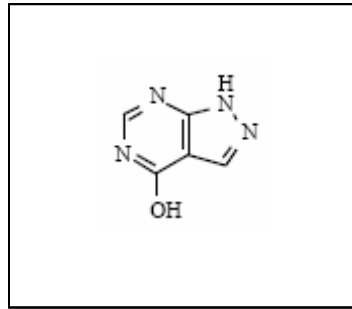


**Figura 10:** Estructura química del tripanotión [N<sup>1</sup>, N<sup>8</sup>-bis (glutathionil)espermidina]

#### 6.2.4- Metabolismo de poliaminas

*T. cruzi* es auxotrófico para las poliaminas, dado que no tiene la primer enzima del camino biosintético, la ornitina decarboxilasa. Obtiene purinas exógenas para la síntesis *de novo* y rescate de bases púricas recicladas. *T. cruzi* convierte las bases púricas a ribonucleótidos mediante una enzima, la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT). Esta enzima, también puede iniciar en estos parásitos el metabolismo de ciertos análogos de purinas citotóxicos. El análogo de purinas **allopurinol**, fue utilizado por muchas décadas para el tratamiento de la gota, ya que es transformado en vertebrados en oxipurinol (**Figura 11**). En tripanosomátidos, los cuales son deficientes en xantina oxidasa, el allopurinol actúa como análogo de purina y es incorporado, a través de la HGPRT al ADN del parásito, interrumpiendo así la síntesis de ARN y proteínas. El mismo es activo en modelos murinos en la fase aguda de la enfermedad de Chagas con marcadas diferencias en la susceptibilidad entre distintas cepas de *T. cruzi*. La información acerca de la eficacia terapéutica del allopurinol en humanos es contradictoria y un estudio multicéntrico llevado a cabo en 1992 en Argentina, Brasil y Bolivia fue interrumpido por encontrarse fallas en la patente terapéutica. La baja incorporación de la droga determinó baja actividad *in vivo* y probablemente las propiedades farmacocinéticas

inadecuadamente evaluadas (Coura JR y Castro SA, 2002; Urbina JA, 2002, Barrett MP y col., 2003).



**Figura 11:** Estructura química del allopurinol (4-hidroxi-pirazol-(3,4d)-pirimidina)

### **6.2.5- Síntesis de ADN**

La dihidrofolato reductasa (DHFR) cataliza el paso crítico en el único camino *de novo* para la síntesis de deoxinucleótidos y ha sido un blanco muy exitoso en el tratamiento específico de muchas enfermedades, incluyendo cáncer, malaria e infecciones bacterianas. Sin embargo, recientemente se ha estudiado como blanco potencial para el tratamiento de la infección por tripanosomátidos. Lowe (Isis Innovation Ltd) presentó una patente introducida en el 2001, que propone la efectividad de los inhibidores de la DHFR (derivados de triazina) en el tratamiento de infecciones parasitarias, incluyendo malaria, enfermedad de Chagas, y Tripanosomiasis Africana: se caracterizaron 19 compuestos sintéticos, 8 de los cuales fueron propuestos como inhibidores de DHFR. También se demostró actividad biológica en modelos murinos para malaria (Urbina JA, 2003).

### **6.2.6- Topoisomerasas de ADN**

Las topoisomerasas de ADN, son enzimas que catalizan cambios topológicos en la molécula de ADN. Su actividad es esencial para la replicación, transcripción, recombinación y condensación del ADN. Las de tipo I cortan

una de las hebras de la doble cadena ADN, y las de tipo II cortan las dos hebras de la doble cadena ADN (Steverding D y Tyler KM, 2005).

Los tripanosomátidos poseen una topoisomerasa de tipo I que, a diferencia de las de otros eucariotas, es una enzima heterodimérica cuyas subunidades están codificadas por genes diferentes. La comparación de las secuencias de aminoácidos de las topoisomerasas de tipo II de *T. cruzi*, *Crithidia fasciculata* y *T. brucei* mostraron un alto grado de conservación. Ambas topoisomerasas, tienen probablemente una localización dual en el núcleo y el mitocondrion de los tripanosomas. A través del uso de la técnica de ARN de interferencia, se ha demostrado que las topoisomerasas de tipo I y II son vitales para *T. brucei*, indicando que estas enzimas son blancos de drogas válidos para la terapia tripanocida. Y por añadidura y muy importante, en tripanosomas las topoisomerasas tienen una función esencial en la replicación del ADN del kinetoplasto.

Los inhibidores de las topoisomerasas de ADN de eucariotas superiores representan el mayor grupo de drogas anticancerígenas. Se han probado sobre *T. cruzi* también derivados de estas drogas, con valores de IC<sub>50</sub> en el rango de nanomolar.

Se han ensayado también fluoroquinolones, inhibidores específicos de las topoisomerasas procariotas de tipo II. A pesar de ser efectivo en el rango de micromolar, esta actividad fue más modesta que la observada en la mayoría de las quinolonas, y aún el compuesto más promisorio de los fluoroquinolones (DW-271), no logró disminuir la parasitemia *in vivo* a dosis tan altas como 100 mg/kg i.d (Steverding D y Tyler KM, 2005).

### **6.2.7- Transcripción**

Los tripanosomátidos regulan la expresión de genes en el núcleo de modo diferente al de los mamíferos. Los productos de la ARN polimerasa II son largos transcritos policistrónicos primarios, procesados luego en unidades génicas pequeñas por la adición de una cola de 3' poliA y una estructura 5' cap de 39 nucleótidos, llamado mini-exón. La interferencia con este proceso de trans-splicing ha atraído la atención como posible blanco terapéutico.

La expresión de algunos genes del kinetoplasto involucran procesos de edición de ARN, en los que se adicionan o remueven residuos de uridina de los transcritos primarios. Este proceso es único en los tripanosomátidos, por lo tanto sus componentes podrían ser buenos blancos para drogas quimioterapéuticas.

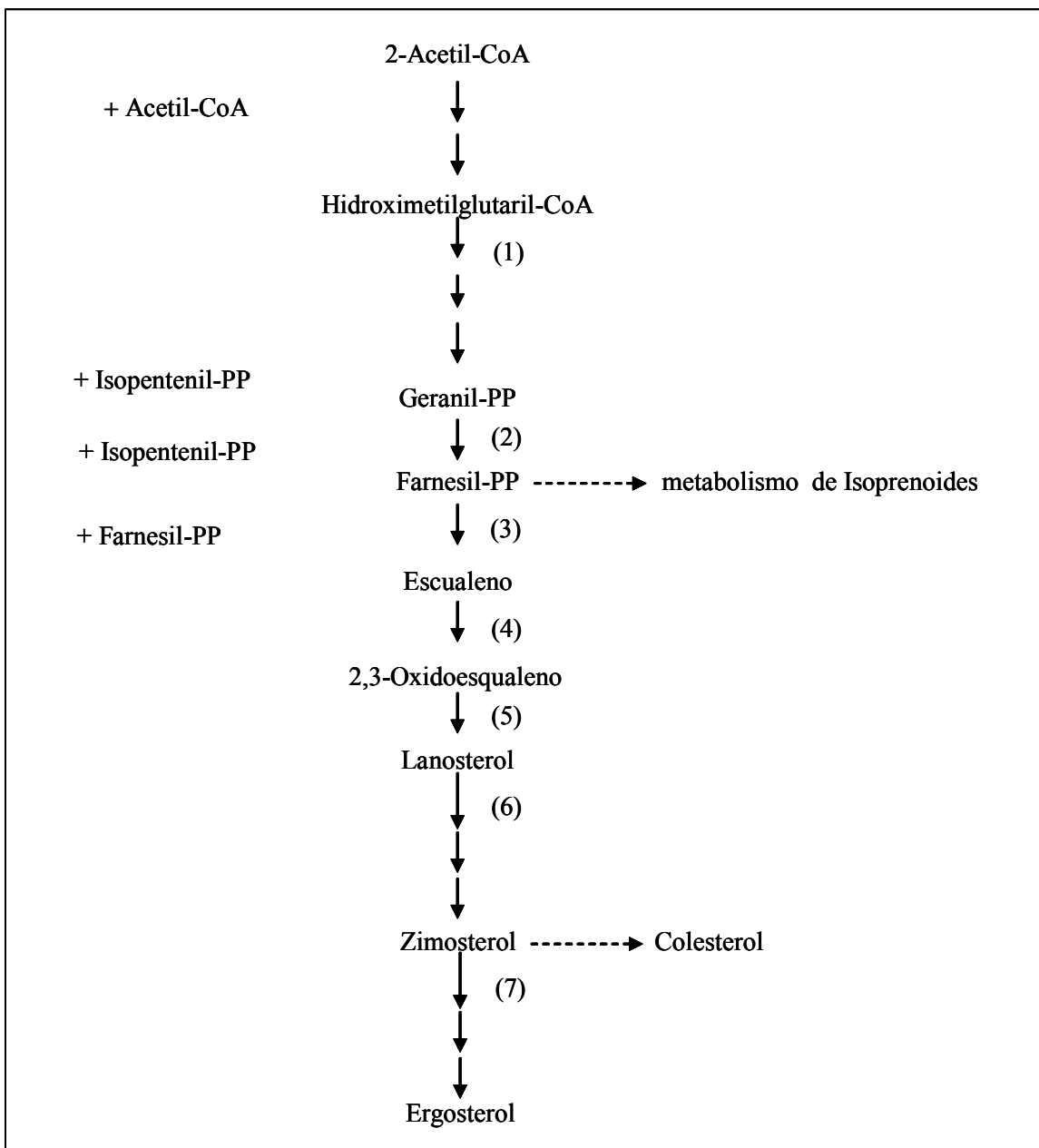
La estructura del kinetoplasto, por sí misma, también ofrece un buen blanco de ataque: los inhibidores de topoisomerasas de ADN, no solo interfieren en el proceso de replicación sino que son también capaces de desintegrar el kinetoplasto y tienen actividad tripanocida (Barreto MP y col., 2003).

### ***6.2.8- Metabolismo de lípidos***

#### ***Biosíntesis del ergosterol***

La composición del sistema de membranas de tripanosomas es distinta de la célula del hospedador mamífero. Como los hongos, los tripanosomas sintetizan ergosterol pero no colesterol. El mismo es importante para la viabilidad y proliferación de todos los estadios del ciclo de vida del parásito y no puede utilizar el colesterol presente en los tejidos donde prolifera o en los medios de cultivo; por esta razón es que *T. cruzi* es tan susceptible a la acción de los inhibidores de enzimas involucradas en la síntesis del ergosterol (Urbina JA y Docampo R, 2002).

Las enzimas de este camino biosintético consideradas claves para la quimioterapia del parásito sobre las que se han ensayado compuestos con resultados promisorios *in vitro* e *in vivo* son: hidroximetilglutaril-CoA reductasa, farnesil pirofosfato sintasa, escualeno sintasa, escualeno epoxidasa, lanosterol sintasa, C14  $\alpha$ - esterol demetilasa, y esterol 24-C-metiltransferasa, representadas en el esquema de la **Figura 12** (Steverding D y Tyler KM, 2005).



12: Esquema simplificado de la biosíntesis del ergosterol. Hidroximetilglutaril-CoA reductasa (1), farnesil pirofosfato sintasa (2), escualeno sintasa (3), escualeno epoxidasa (4), lanosterol sintasa (5), C14  $\alpha$ - esterol demetilasa (6), y esterol 24-C-metiltransferasa (7) (Steverding D y Tyler KM, 2005).

En este sentido, se ha estudiado que inhibidores de la C14  $\alpha$ - esterol demetilasa dependiente de citocromo P450 disponibles comercialmente y utilizados con mucho éxito en el tratamiento de micosis superficiales y sistémicas, como **ketoconazol** ó **itraconazol**, no han sido capaces de erradicar el *T. cruzi* de animales experimentales o pacientes. De todos modos,

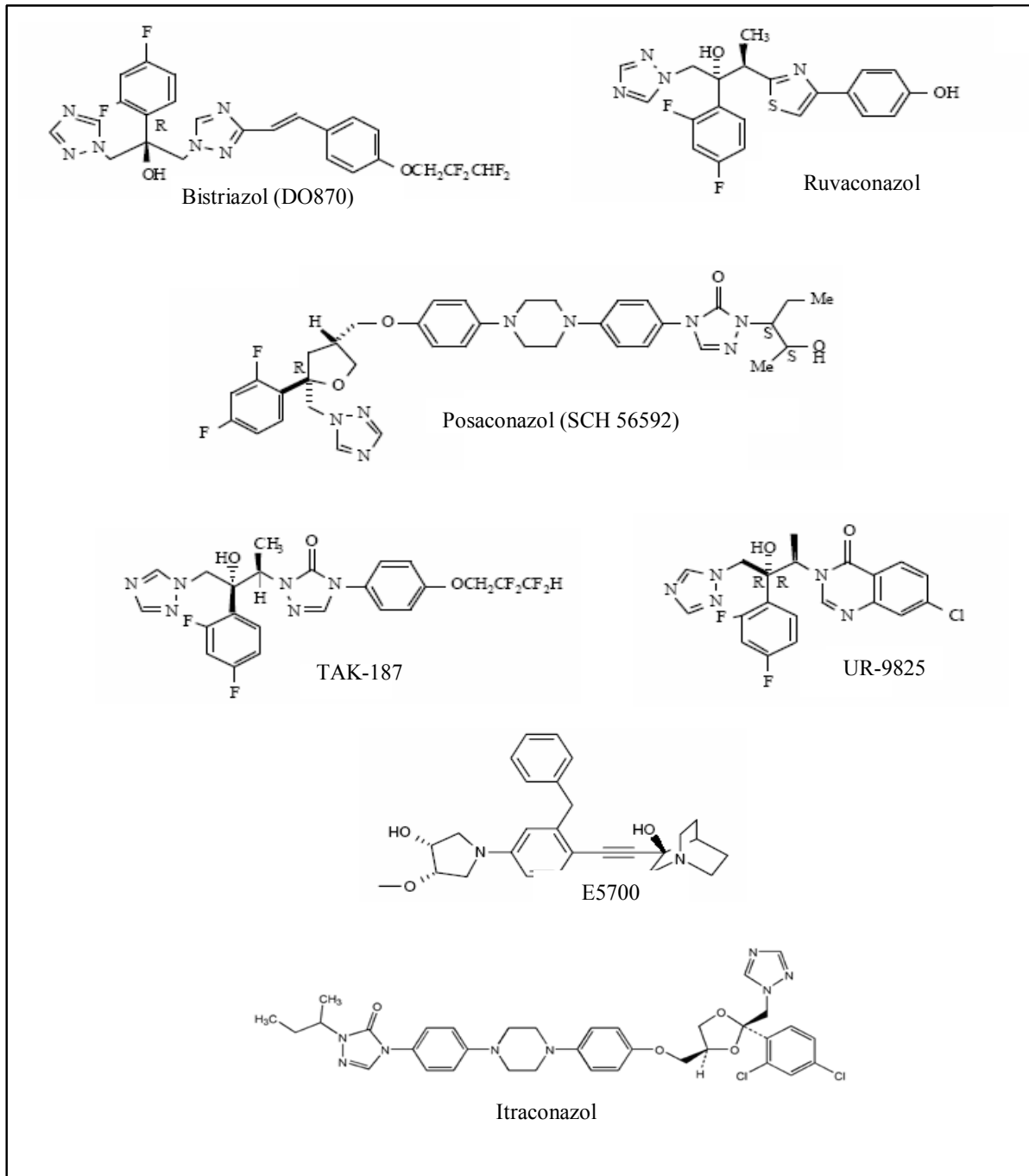
en la década pasada, el grupo de Urbina en Venezuela, ha desarrollado nuevos derivados de triazoles que no sólo inhiben la esterol C14  $\alpha$ - demetilasa dependiente de citocromo P450 de hongos y protozoos, sino que fueron capaces de provocar una cura parasitológica total en infecciones agudas y crónicas causadas por el parásito en modelos murinos. Estos compuestos, el **bistriazol (D0870)** y el **posaconazol (SCH 56592)**, son activos por vía oral y tienen muy baja o nula toxicidad en mamíferos, y se demostró también que son activos *in vivo* contra cepas naturalmente resistentes a nitrofuranos y nitrimidazoles. La actividad *in vivo* de este tipo de compuestos se debe a la combinación de las bajas concentraciones a las cuales son inhibitorias (nanomolar o menores) y a las propiedades farmacocinéticas especiales (grandes volúmenes de distribución y prolongados períodos de vida media).

El posaconazol, es un análogo estructural del itraconazol, y es el que está en la fase III de estudios clínicos como antifúngico sistémico, y como candidato para el tratamiento de pacientes con la enfermedad de Chagas.

Más recientemente, han sido caracterizados otros componentes triazólicos como el **UR-9825** (Uriach y Compañía), **TAK-187** (Takeda Chemical Company) y **ravuconazol** (BMS 207, 147, Bristol Meyers, Squibb), con actividad anti *T. cruzi in vivo* comparable o superior a aquellos del D08070 ó posaconazol.

Muchos compuestos que inhiben otras enzimas del camino de biosíntesis del ergosterol, han sido estudiados y ensayados con criterios de búsqueda semejante a los que se describieron para los inhibidores de la C14  $\alpha$ - esterol demetilasa. Tal es el caso, de lovastatina como inhibidor de hidroximetilglutaril-CoA reductasa, el pamidronato y el bifosfonato risedronato como inhibidores de la farnesil pirofosfato sintasa, y el **E5700** relacionado con la inhibición de la escualeno sintasa; entre los más destacados. Pese a que han mostrado resultados promisorios como posibles quimioterapéuticos, ninguno ha alcanzado hasta ahora, los logros de los derivados triazólicos (Steверding D y Tyler KM, 2005; Urbina JA y Docampo R, 2003).



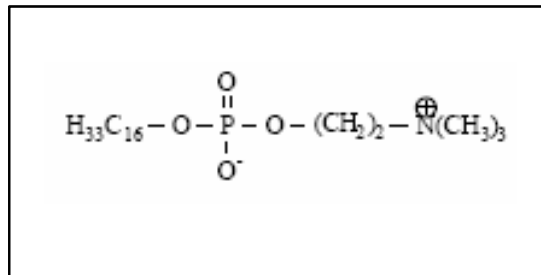


**Figura 13:** Estructura química del itraconazol y nuevos derivados triazólicos, inhibidores de la C-14  $\alpha$ -esterol demetilasa de *T. cruzi*.

Metabolismo de fosfolípidos

La fosfatidil-colina es el fosfolípido principal de membrana de *T. cruzi*. La síntesis de la misma en protozoarios y hongos es a través del camino de Greenberg (transmetilación) a diferencia del hospedador vertebrado, donde predomina el camino de Kennedy (CDP-Colina).

Los alquil-isofosfolípidos (ALP), análogos sintéticos de los lisofosfolípidos, han sido desarrollados como agentes antitumorales y anti-leucémicos en las últimas dos décadas. Estos compuestos han mostrado actividad contra parásitos tripanosomátidos, incluyendo a *T. cruzi* tanto *in vivo*, como *in vitro*. La miltefosina (**Figura 14**) es un promisorio agente tripanocida, con buena actividad oral y baja toxicidad y se encuentra en estudios clínicos avanzados. Su actividad anti-*T. cruzi* reside en el bloqueo selectivo de la biosíntesis de fosfatidilcolina, la cual se mencionó es diferencial respecto a la del hospedador mamífero (Docampo R, 2001; Urbina JA, 2002). No ha sido reportado aún el alcance en la cura de la enfermedad de ninguno de los análogos de lisofosfolípidos y además parecen ser más activos en combinación con inhibidores de la síntesis del colesterol (Steverding D y Tyler KM, 2005).



**Figura 14:** Estructura química de la miltefosina (hexadecil-fosfocolina).

### **6.2.9- Degradación de proteínas**

El proteosoma eucariótico es un complejo proteico multicatalítico responsable de la degradación de la mayoría de las proteínas intracelulares. La subunidad S20 del proteosoma es una estructura cilíndrica formada por 4 anillos. Dos de los anillos internos están compuestos de 7 subunidades  $\beta$ . En cada anillo, tres de estas subunidades contienen las actividades catalíticas más importantes, la peptidil-glutamil hidrolasa, la actividad tipo tripsina, y la tipo quimotripsina, localizadas sobre las subunidades  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_5$  respectivamente. Bloqueando selectivamente la expresión de las subunidades  $\beta$  con RNA de interferencia se demostró que son esenciales para tripanosomas, señalando al proteosoma como un blanco válido para el desarrollo de drogas tripanocidas. Mejor aun, el proteosoma de los tripanosomátidos posee diferente especificidad de sustrato respecto del proteosoma de mamíferos.

Los inhibidores del proteosoma son usualmente análogos de sustratos peptídicos cortos modificados químicamente en el C terminal.

Los primeros inhibidores fueron los peptido aldehidos, siendo el más activo el PSI. La especificidad de estos inhibidores se mejoró con un agregado de vinil sulfona (VSMes) y de trileucinas.

Estos hallazgos indican que los tripanosomas son sensibles a la inhibición de la actividad tipo tripsina.

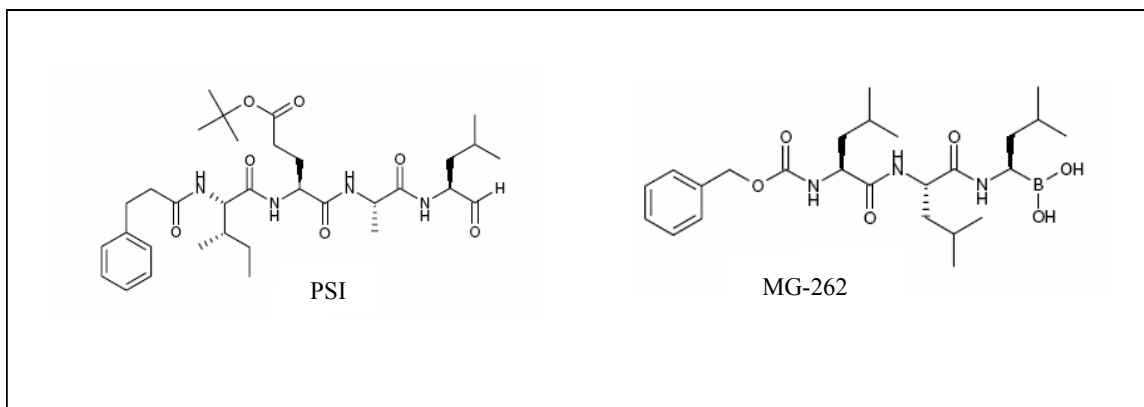
Una situación similar se observó recientemente con los inhibidores del proteosoma  $\alpha'$ ,  $\beta'$  epoxicetonas, los más selectivos conocidos hasta el momento.

Los derivados del ácido bórico son una nueva clase de inhibidores del proteosoma con actividad tripanocida muy promisoriosa. Los péptidil boronatos, son inhibidores mucho más selectivos y potentes que sus correspondientes aldehidos como el MG-262 (**Figara 15**) (Sterveding D y Tyler KM, 2005).

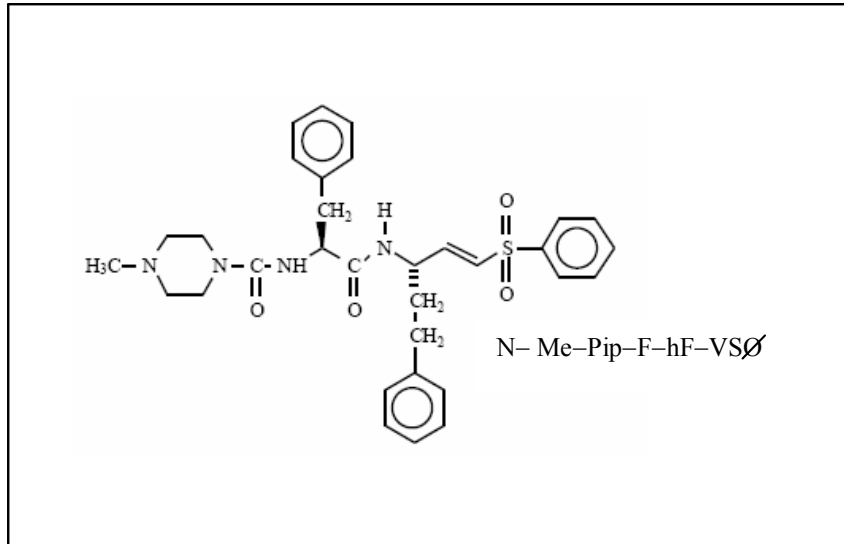
*T. cruzi* contiene una catepsina con actividad proteasa dependiente de cisteína denominada **cruzipaína**, responsable de la mayor actividad proteolítica en todos los estadios del parásito. Los inhibidores selectivos de esta proteasa bloquean la proliferación de los estadios epimastigote y amastigote y detiene

## Introducción

la metaciclologénesis *in vitro*, indicando que la actividad de la enzima es indispensable para la supervivencia y desarrollo del parásito. Los genes que codifican para la cruzipaina han sido clonados y expresados, se cristalizó y determinó la estructura molecular de la enzima recombinante y se diseñaron inhibidores basados en la relación estructura-actividad (SAR). Uno de ellos, el N-metil-piperazine-urea-F-hF-vinil-sulfone-fenil (**Figura 16**), es un inhibidor peptídico que puede prolongar la sobrevida e inducir la cura de las fases agudas y crónicas de la enfermedad de Chagas en modelos murinos, con mínima toxicidad. Recientemente, se han identificado nuevos inhibidores de cruzipaina con actividad potente y selectiva como los inhibidores no peptídicos, de los que fue descripta su SAR sobre las bases de su estructura y el mecanismo de la enzima. La estructura no peptídica de estos compuestos, el pequeño tamaño y el bajo costo, hacen a estos compuestos promisorios para el desarrollo de drogas. Teniendo en cuenta estos resultados, la cruzipaina es un blanco atractivo anti-*T. cruzi*, y fueron identificadas siete patentes en la literatura desde 1999-2002 que tratan a inhibidores de la cruzipaina como agentes anti-*T. cruzi*. En el 2002, Celera genomics (<http://www.celera.com/>) anunció que el Institute for One World Health (<http://www.oneworldhealth.com>.) y el National Institute of Health (<http://www.nih.gov/>) habían iniciado el desarrollo del compuesto de su propiedad CRA-3316, un inhibidor específico de cruzipaina, como tratamiento potencial de la enfermedad de Chagas. (Sterveding D y Tyler KM, 2005; Urbina JA y Docampo R, 2003).



**Figura 15:** Estructura química de los inhibidores del proteosoma con actividad tripanocida promisoriosa.



**Figura 16:** Estructura química del N-metil-piperazine-urea-F-hF-vinil-sulfone-fenil, un inhibidor irreversible de la cruzipaina.

#### **6.2.10- Proteínas de membrana, transportadores e incorporación de drogas**

Los parásitos toman los nutrientes desde sus hospedadores a través de transportadores de la membrana plasmática. El bloqueo de transportadores vitales podría matar al parásito y el transporte de nutrientes podría representar un buen blanco.

Los transportadores de membrana específicos, pueden también asistir en la selectividad de drogas contra parásitos.

Muchas de las principales proteínas estructurales de superficie de protozoos parasitarios, como la transialidasa en *T. cruzi*, están unidas a través de glicofosfatidil inositol (GPI). El camino biosintético de las GPI de anclaje ha demostrado ser esencial y se han producido inhibidores específicos de las enzimas que lo regulan, que son algo diferentes de las de los mamíferos (Barret MP y col., 2003).

Los tripanosomátidos son incapaces de sintetizar ácido siálico (AS), pero pueden incorporarlo desde sus hospedadores mamíferos a través de la acción de una única neuroaminidasa con actividad trans-sialidasa, la cual puede transferir AS de los glicoconjugados del huésped a moléculas tipo mucinas localizadas en la superficie de la membrana celular del parásito. Esta reacción

parece ser esencial para la sobrevivencia de *T. cruzi* y la invasión celular. Así, los inhibidores de las transalidasas son potenciales agentes tripanocidas (Urbina JA, 2003).

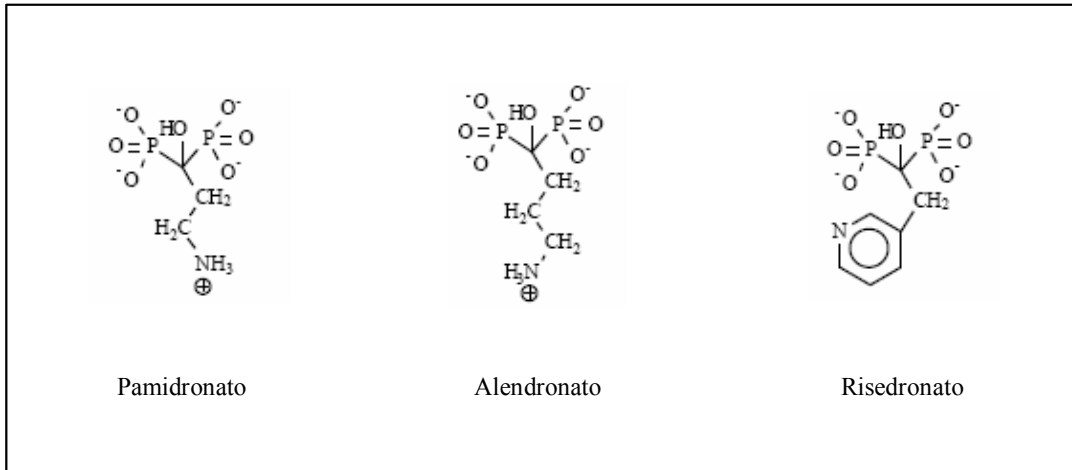
### **6.2.11- Metabolismo del acidocalcisoma**

Esta organela es el principal reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y su liberación desde la matriz acidocalcisomal está regulada por mecanismos que incluyen una ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$ , un intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y bombas de  $\text{H}^+$  ATPasa y pirofosfatasas. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  acidocalcisomal no es inhibida por análogos del amiloride, pero puede ser efectivamente bloqueado por compuestos tales como 3,5-dibutil-hidroxitolueno. Así, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  acidocalcisomal es el único mecanismo involucrado en la homeostasis en parásitos antiprotozoarios, motivo por lo que se lo considera un potencial blanco interesante de drogas. De acuerdo con estas expectativas, en 1999, una patente de Hoechst Marion Russel Deutschland GbH presentó el uso de inhibidores de intercambiadores de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  para el tratamiento de infecciones protozoarias tales como malaria, toxoplasmosis, coccidiosis, criptosporidiosis, leishmaniasis y enfermedad de Chagas.

Los contraiones más importantes del calcio y del magnesio en los acidocalcisomas son polifosfatos de cadena corta, principalmente pirofosfato, tri y tetrafosfato. También se ha demostrado que existen enzimas específicas involucradas en la transducción de energía dependientes de pirofosfatos, como la bomba de protones presente en los acidocalcisomas y la membrana plasmática del parásito y que los polifosfonatos son rápidamente movilizados e hidrolizados en células sometidas a estrés osmótico y nutricional, lo que demuestra su importancia en el mantenimiento de los niveles energéticos y de la homeostasis iónica de estas células.

Los bifosfonatos, que ya fueron descritos como inhibidores de la farnesil-pirofosfato sintetasa en la ruta metabólica de los esteroides, son análogos no metabolizables del pirofosfato que pueden inhibir también enzimas involucradas en reacciones de pirofosfatos inorgánicos y orgánicos tales como

la escualeno sintasa, o pirofosfatasa (bomba de protones) (**Figura 17**) (Urbina JA 2003; Coura JR y Castro SA, 2002).



**Figura 17:** Estructura química de los bifosfonatos, análogos no hidrolizables de pirofosfatos, con actividad selectiva anti- *T. cruzi*.

### 6.2.12-Metabolismo de aminoácidos

*T. cruzi* es altamente dependiente del metabolismo de aminoácidos en diversas situaciones, como los procesos de diferenciación celular y la resistencia al estrés. Las drogas contra enzimas ó moléculas que intervienen en este metabolismo, como los mismos transportadores de aminoácidos, podrían acercarnos al desarrollo de una quimioterapia tripanocida. En este sentido, enzimas como la quinasa de arginina, la fosfoenolpiruvato kinasa y la racemasa de prolina, han sido identificadas, caracterizadas y son diferenciales entre el metabolismo energético del parásito y su hospedador mamífero ya que están ausentes en este último. Otras enzimas están presentes en ambos organismos, pero los mecanismos por los cuales catalizan sus reacciones bioquímicas son distintas, o la identidad de secuencia entre ellas es lo suficientemente baja como para que sus sustratos y sensibilidad a inhibidores sea diferencial. Ej: Glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> y cistationina β sintasa (Silber AM y col., 2005).

**6.2.13- Muerte celular programada**

La *muerte celular programada* (PCD) es un proceso celular suicida intrínseco, esencial en la biología celular y está involucrado en la regulación del crecimiento y desarrollo de organismos. Es el mecanismo común por el cual mueren las células tumorales, espontáneamente o en respuesta a agentes terapéuticos, ó a mediadores celulares como el óxido nítrico. Otros agentes o situaciones que inducen a PCD, son el estrés celular, el suero ó carencia de factores de crecimiento. Puede estar coordinado por una red compleja de reguladores y efectores y se manifiesta con ciertas características morfológicas y bioquímicas que se incluyen en el término *apoptosis*. Algunas de ellas son:

- cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática.
- activación de actividad de proteasas.
- condensación y fragmentación de la cromatina en oligonucleosomas de 180-200 pb por acción de endonucleasas.
- ruptura de la célula dentro de cuerpos apoptóticos que son fagocitados por las células vecinas.

Este mecanismo de muerte estaba sólo descrito en organismos multicelulares; sin embargo se ha demostrado y está actualmente en estudio la PCD y los mecanismos moleculares que la determinan, en organismos unicelulares. En tripanosomátidos y otros organismos unicelulares patógenos se han encontrado características apoptóticas.

Las diferencias entre los caminos de PCD en organismos unicelulares y multicelulares espera la caracterización de moléculas efectoras y reguladoras en los primeros. Muchos efectores que inducen PCD en células eucariotas, como el suero ó el estrés oxidativo, causan una muerte apoptótica también en *T. cruzi*. Recientemente se ha descrito que el veneno de *B. jararaca* induce PCD en epimastigotes (Deolindo P y col., 2005). De todos modos existe un vacío en el entendimiento de PCD en organismos unicelulares, ya que son pocos los componentes de este camino que han sido descritos. Kosec y col., describen que las metacaspasas podrían estar involucradas en los caminos de PCD de los parásitos. La identificación y caracterización molecular de genes que confieren a los parásitos una verdadera citoprotección celular contra el estrés del medio que los rodea, y que contribuyen a la señalización “apoptótica”, podría



vislumbrar el mecanismo de control de muerte celular en kinetoplastidos. La caracterización molecular de estos genes, permitiría explorar la posibilidad de modular sus funciones, por la generación de pequeños compuestos activantes/desactivantes para una quimioterapia basada en la manipulación del proceso de apoptosis de estos organismos (Ouaissi A, 2003; Debrabant A y col., 2003, Kosec G., y col 2001).

### **6.3- Drogas ensayadas experimentalmente entre 1992/1993 -2002**

No sólo la búsqueda de blancos en el parásito ha sido el centro de estudio en el desarrollo de una quimioterapia para la enfermedad de Chagas. Otros diseños basados en relación estructura-actividad (SAR), y derivados y análogos de drogas tripanocidas, en particular derivados del nifurtimox, han sido sintetizados dando lugar a drogas con potencial actividad tripanocida al igual que la búsqueda de nuevos compuestos naturales. Muchas de las drogas que son hoy usadas, son productos naturales o sus derivados. Más aún, no es sorprendente que algunas sustancias naturales posean actividad tripanocida, muchos de estos compuestos, incluyendo alcaloides, derivados fenólicos, quinonas y terpenos, han mostrado que inhiben el crecimiento de tripanosomas *in vitro*.

En este sentido, al igual que en los caso del allopurinol, ketoconazol, itraconazol y fuconazol, que son drogas que llegaron a fases de estudio clínico y estuvieron en el mercado en base al diseño de compuestos sobre blancos del parásito, otros compuestos desarrollados en este campo, también mostraron muy buena actividad en modelos murinos y estan siendo investigados como posibles drogas tripanocidas. Entre ellas estan las drogas desarrolladas **sintéticamente** como:

- Derivados de tiadiazina
- Derivados de N-oxido de 1,2,5-oxadiazol
- 1,4-dihidropiridinas
- Derivados de acridina
- Derivados de nitroimidazoles y nitrofuranos
- Fenotiazinas

- Complejos metálicos [complejos *de rutenio (II)*, *rutenio (III)* y *rodio (II)*] y agentes quelantes de metal
- Derivados de propén-1-amino
- Derivados de aminoquinolina
- Dinitroanilinas

Y las drogas derivadas de **fuentes naturales** como:

- Alcaloides
- Taxoides
- Derivados heterocíclicos de estilbenoides
- Veneno de serpiente
- Gangliósidos
- Inhibidores de la hormona juvenil y análogos (*Metoprene*)
- Propóleo
- Naftoquinonas y derivados sintéticos
- Extractos crudos de plantas y sus componentes
- Fenoles
- Terpenos

(Coura JR y Castro SA, 2002; Steverding D y Tyler KM, 2005)

## **7- *Camellia sinensis***

La especie vegetal *C. sinensis* ha estado relacionada con la vida de la gente desde el comienzo de la historia, y fundamentalmente es utilizada para preparar tes. Los componentes en las hojas poseen características químicas que le dan a la infusión de té un aroma atractivo, buen sabor y efectos benéficos para la salud. Estas son las razones por las cuales el té ha sido una de las infusiones más populares. En China, la gente utilizaba las hojas o la infusión como medicina desde 3000 años antes de la Era Cristiana, y posteriormente para preparar una bebida lujosa. Actualmente es consumido por dos terceras partes del mundo y la planta de té es cultivada en más de 20 países de Asia, África, y América del Sur; como una de las plantas de horticoltivo favoritas, como el café y el cacao (Yamamoto T, 1997; Lin YS y col., 2003).

### **7.1- Clasificación**

La planta de té está taxonómicamente clasificada como *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze de la familia *Theaceae*, la cual está compuesta por las siguientes especies:

*C. irrawdiensis*

*C. taliensis*

*C. gracilipes*

*C. pubicostas*

*C. sinensis*

var. *assamica*

var. *sinensis*

Las variedades *assamica* y *sinensis* se diferencian tanto en el tamaño de la hoja y forma de la planta como también en las zonas donde crecen espontáneamente. *C. sinensis* var. *assamica* tiene una hoja alargada y el tronco es alto, crece espontáneamente desde la provincia de Yan-nan en China, hasta el norte de la región de Myanmar y Asma de India. Por el otro lado, la var. *sinensis* tiene una hoja más pequeña, el tronco es del tipo arbusto y se observa en los distritos este y sudeste de China (Yamamoto T, 1997).

## **7.2- Procesos de producción de tes.**

Uno de los procesos más importantes en la manufacturación de té para beber es la fermentación. La conversión de taninos se lleva a cabo por enzimas presentes en las hojas de té, por lo que este proceso debería llamarse “enzimación”.

El grado de fermentación afecta grandemente la calidad y tipo de té y de acuerdo a esto se clasifican en:

- Té verde. Este es un té no fermentado.
- Té oo-long. Té semi-fermentado.
- Té negro. Té completamente fermentado.

La enzima que realiza la fermentación es la polifenol oxidasa y el contenido de polifenoles en las hojas de té jóvenes difiere entre las variedades de cultivos. Aquellas plantaciones que muestran una mejor fermentabilidad y alto contenido de polifenoles son seleccionadas para manufacturar té negro, generando un té rico en teaflavinas y tearubiginas; polifenoles oligoméricos (Yamamoto T, 1997; Henning SM y col., 2004; Crespy V y Williamson G, 2004). La mayoría de todos los cultivares pertenecientes al grupo de la var. *sinensis*, tienen relativamente baja fermentabilidad y menos contenido de polifenoles y son utilizados para la preparación del té verde. Así, una característica distintiva del procesamiento del té verde, es que las hojas nunca son sujetas a las condiciones que causan fermentación. En el caso de la manufacturación del té verde, las hojas frescas cosechadas son inmediatamente sometidas al vapor a 95-100 °C por 30-45 segundos para inactivar las enzimas que contienen, en especial la polifenol oxidasa. Este proceso protege la degradación de vitaminas y la oxidación de catequinas, y así, el contenido de estos compuestos es mucho mayor en el té verde (Green tea) que en los tes fermentados (Yamamoto T, 1997).

## **7.3- Componentes del té verde**

La composición del té varía entre especies, en cada estación de cosecha, con edad de la hoja, clima y prácticas hortícolas.

Los mayores componentes de las hojas de té son los carbohidratos incluyendo fibras de celulosa, y las proteínas; pero estos componentes son insolubles. Sólo los componentes de relativamente bajo peso molecular que son extraídos con agua caliente, son los que le dan un carácter específico a la infusión de té verde (Yamamoto T, 1997).

La infusión está caracterizada por contener aquellos componentes del té tales como: polifenoles, cafeína, teína, vitaminas, etc. Dentro de éstos, los polifenoles son el grupo mayoritario, y pueden llegar a representar más del 30% de la hoja seca (Lin YS y col., 2003). A pesar que existen al menos 10 clases diferentes de polifenoles en base a la estructura química, el té verde es rico en un grupo particular que son los flavan-3-ol, comúnmente conocidos como catequinas. El té verde es el tipo de té que mayor concentración de catequinas posee, comparado con el oo-long y el negro. Esto es consecuencia del mencionado proceso de manufacturación, ya que durante la fermentación se produce oligomerización de estos monómeros de flavan-3-ol, a través de la polifenol oxidasa. Los productos de esta polimerización son: teaflavinas y tearubiginas, que se describieron también como compuestos mayoritarios del té negro.

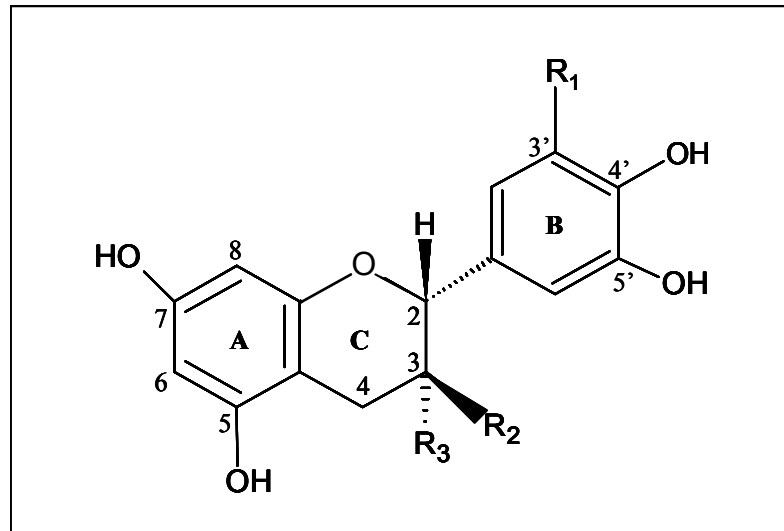
Las catequinas son los compuestos que poseen la mayor actividad biológica del té verde y reponsables de la suave astringencia y el sabor amargo de la infusión (Yamamoto T, 1997; Lin YS y col., 2003).

### **7.4- Estructura química de las catequinas**

Las catequinas del té verde son una clase de flavanoles que poseen 15 átomos de carbono, y sus derivados están compuestos de dos núcleos fenólicos (A y B) conectados por tres unidades de carbono (C-2, C-3, y C-4). La estructura flavanol de la catequina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavano) está caracterizada por tener un núcleo fenólico en el C-2, como otros polifenoles, pero se diferencia por poseer un grupo hidroxilo en el C-3 y ausencia del grupo carbonilo en el C-4 (**Figura 18**) (Yamamoto T, 1997; Bohm BA, 1998). El C-3 constituye un centro quiral, dando lugar a las configuraciones 2R, 3S y 2R,

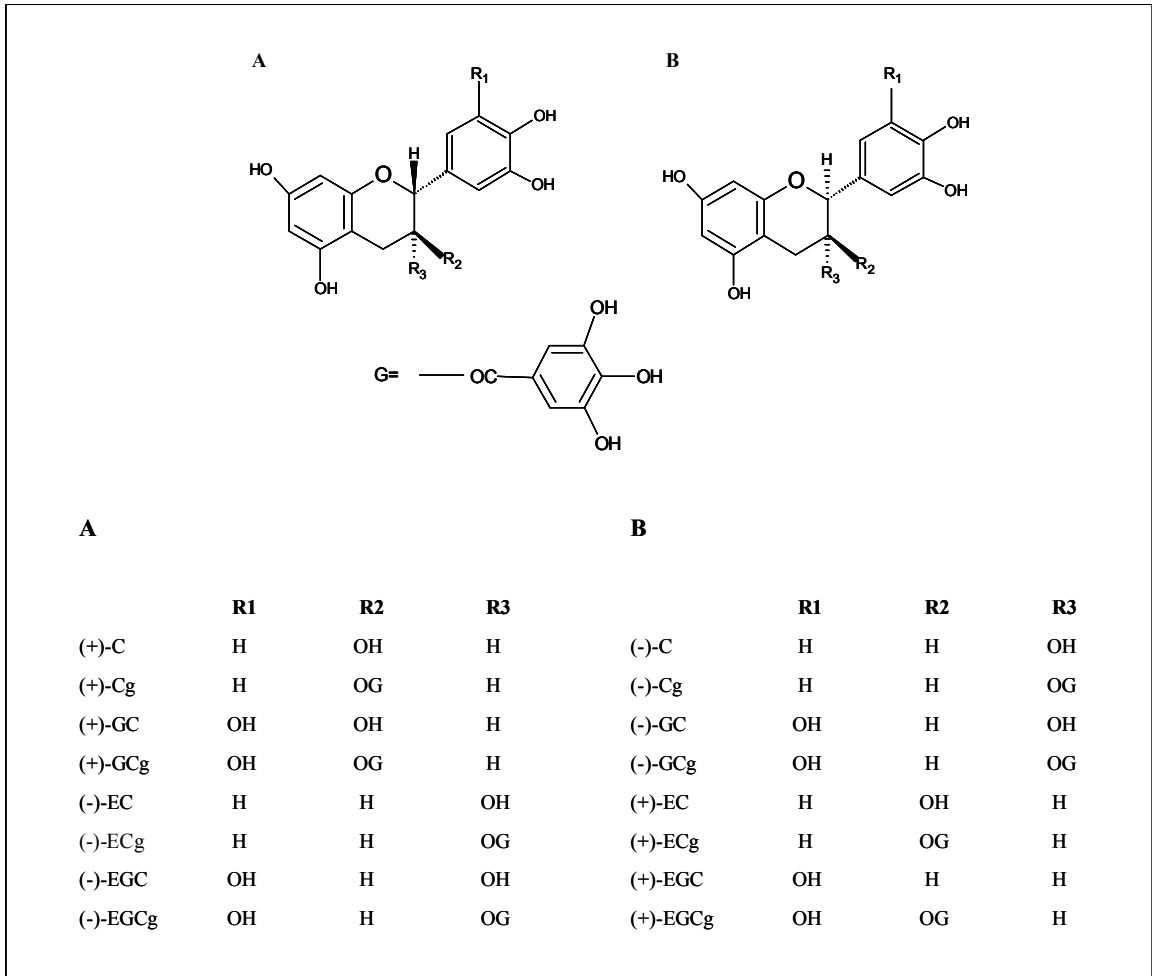
3R. Estos últimos (2R, 3R) llevan el prefijo “epi”. Así la (+)-catequina es 2R, 3S, mientras que la (-)-epicatequina tiene configuración 2R, 3R.

A su vez el C-2 de las catequinas puede tener la configuración 2S, generando los enantiómeros de las mismas (Bohm BA, 1998).



**Figura 18:** Estructura química de los flavanoles.

Las catequinas pueden estar esterificadas en el grupo hidroxilo del C-3 con un ácido gálico y/o tener un grupo hidroxilo en el C-5'. De esta forma, las estructuras químicas como la orientación de sus átomos clasifican a las distintas catequinas en: (+)- Catequina, ((+)- C); (-)- Epicatequina, ((-)- EC); (+)- Galocatequina, ((+)-GC); (-)-Epigalocatequina ((-)- EGC); (+)- Galato de catequina, ((+)- Cg); (+)- Galato de epicatequina, ((-)-ECg); (+)- Galato de galocatequina, ((+)-GCg); y (-)- Galato de epigalocatequina, (-)- EGCg) y sus correspondientes enantiómeros (**Figura 19**) (Yamamoto T, 1997).



**Figura 19:** Estructura química de las catequinas **A-** Catequinas y epímeros de catequinas.

**B-** Enantiómeros de catequinas y sus epímeros (Yang B y col., 2000).

Las catequinas presentes en el té verde principalmente extraídas con acetato de etilo son: (+)- C, (-)- EC, (+)-GC, (-)- EGC, (-)-ECg, (-)-GCg; y (-)- EGCg (Yamamoto T, 1997).

### 7.5- Extracción, purificación e identificación de las catequinas

Las catequinas, como se mencionó anteriormente, son compuestos polares, que pueden ser extraídos a partir de una solución acuosa con diferentes solventes orgánicos como éter etílico, diclorometano y acetato de etilo (Yamamoto T, 1997; Bohm BA, 1998). Existen diferentes protocolos de extracción que varían del ó los solventes utilizados, como el orden y tiempo en

los que se realiza la extracción con cada uno de ellos. Algunos autores seleccionan un solvente al que combinan con agua (Bohm BA, 1998). Dentro de los métodos de separación de las catequinas, son muy utilizadas las técnicas cromatográficas tanto en columna, como en placa. En la cromatografía en placa, han sido utilizados como adsorbentes, celulosa, sílica gel, y poliamidas. En la cromatografía en columna (CC), el Sephadex de la serie LH (LH-20 y LH-60) es de particular valor en el estudio de flavonoides (Bohm BA, 1998). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: High Performance Liquid Chromatography), asociada a un detector de diodos, es una técnica ampliamente utilizada para la identificación de las catequinas en una mezcla (Bohm BA, 1998; Yang B y col., 2000).

### **7.6- Propiedades físico- químicas de las catequinas**

Ellas son químicamente muy reactivas, poseen propiedades quelantes de metales, inactivantes de radicales oxidantes, etc.

Es sabido que los polifenoles forman varios complejos en reacción con la cafeína, proteínas y péptidos, iones metálicos, ó ciclodextrinas. En presencia de oxígeno disuelto, es altamente probable que las propiedades químicas de la formación de complejos de los polifenoles del té verde con las sustancias mencionadas, estén muy relacionadas a las funciones fisiológicas de los polifenoles del té verde (Yamamoto T, 1997).

Durante los procesos de manipulación, las catequinas deben ser protegidas del exceso del oxígeno atmosférico y la luz directa. También deberían evitarse los pH extremos, dado que los compuestos fenólicos son sensibles a la oxidación bajo condiciones alcalinas (Bohm BA, 1998).

### **7.7- Propiedades biológicas y farmacológicas de las catequinas**

Como se mencionó anteriormente, el té verde es una infusión mundialmente consumida a la cual se le atribuyen desde la antigüedad, efectos benéficos para la salud, como: actividades anticancerígenas, bactericida, antiinflamatoria, prevención de enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares,



disminución de la presión sanguínea y de los niveles de colesterol en sangre, prevención de caries, etc.

Hoy existen numerosos trabajos que describen las actividades biológicas por las cuales las catequinas del té verde, y en especial la (-)-EGCg ejercen estos efectos farmacológicos.

De todos modos, hay evidencias controvertidas sobre el mecanismo por el cual los polifenoles ejercen estas actividades farmacológicas:

- Un gran número de mecanismos que incluyen el impacto de la (-)-EGCg sobre un amplio rango de moléculas blanco que influyen el crecimiento celular y apoptosis han sido propuestos como causa de la actividad anticancerígena, al igual que los mecanismos antioxidantes. En cambio otras evidencias que muestran que los efectos de la EGCg en el cultivo celular podrían ser consecuencia de reacciones oxidativas o pro-oxidativas.

- Se han encontrado también resultados contradictorios en la literatura, en cuanto a su efecto sobre la producción de óxido nítrico. En algunos artículos se describe a las catequinas como inductores de la producción de óxido nítrico, mientras que en otros, las asocian a un efecto supresor de esta producción a través de la inhibición del factor nuclear- $\kappa$ B (NF-  $\kappa$ B) (Kolodziej H y col., 2001).

- Otra actividad biológica muy estudiada de la EGCg, y para la cual también se han encontrado efectos contrapuestos, es la actividad antioxidante. Así, como la actividad oxidante provoca un efecto benéfico en cierto sistema de estudio, puede no serlo en otro; y más aún puede tener el efecto opuesto según el tipo celular o patología en estudio (Yang CS y col., 2004).

A su vez, otra característica de la EGCg como la de otros polifenoles, es que la actividad farmacológica observada, puede ser consecuencia de más de una actividad biológica. Por ejemplo, en cuanto a la prevención de caries descrita para la EGCg, algunos autores la describen como consecuencia de la actividad bactericida. Según los distintos trabajos publicados esta actividad biológica puede estar dada por la inhibición específica de la EGCg sobre la glicosil transferasa de *Streptococcus sobrinus*, mientras que otros atribuyen la actividad bactericida a la producción de peróxido de hidrógeno de las catequinas (Hamilton – Miller JM, 2001; Arakawa H y col., 2004).

De esta forma se podrían enumerar cientos de actividades biológicas que pueden diferir según el modelo y las condiciones de estudio. Esto hace de las catequinas compuestos muy versátiles en cuanto a su mecanismo de acción y propiedades biológicas y farmacológicas.

Hay pocos trabajos en los que se relaciona a las catequinas con las enfermedades parasitarias. Está descrita la actividad tripanocida de varias catequinas sobre la forma amastigote de *L. donovani*, pero el mecanismo de acción es sobre las actividades inmunológicas de los macrófagos activados, y no sobre el parásito (Kolodziej H y col., 2001). Existen otros flavonoides que poseen actividad antiparasitaria *in vitro*, como es el caso de la quercetina sobre *T. brucei*, y polifenoles extraídos del propoleo sobre *T. cruzi* (Marcucci MC y col., 2001).

### 7.8- Farmacocinética de las catequinas

En ciertos casos, las funciones biológicas de las catequinas observadas *in vitro* no tienen correlato cuando se las ensaya *in vivo*. Los efectos que producen estos compuestos *in vitro* se han logrado con concentraciones mayores a las observadas en plasma o tejidos de animales, luego de la administración oral de té verde ó catequinas puras (Yang CS y col., 2002; Kan N y col, 2006).

Una de las razones para ello es la baja biodisponibilidad de las catequinas del té verde en mamíferos.

En la absorción oral, el factor relevante más importante son las características fisiológicas de las drogas. Las catequinas se disuelven en agua, porque son compuestos fenólicos de naturaleza débilmente ácida. Bajo condiciones farmacológicas, estas catequinas deberían, en principio, existir en la forma deionizada. Como para la mayoría de las drogas la solubilidad de las moléculas deionizadas, podría estar reducida y por lo tanto impedir la absorción por el tracto gastrointestinal. De todos modos compuestos con el grupo galato, podrían unirse potencialmente a proteínas de la superficie de la membrana por uniones hidrógeno a través de los grupos fenólicos, por ejemplo las proteínas de la saliva y mucosas. La formación del complejo catequina-proteína podría minimizar la absorción de las catequinas por disminución de su solubilidad acuosa. Esta interpretación es sustentada por los datos de

biodistribución obtenidos de estudios previos que muestran que las concentraciones de EC y EGCg en el intestino fueron 7.6 y 1.7 veces mayores en comparación a las observadas en plasma.

Sumado a la absorción y al efecto del primer paso (absorción en intestino), la magnitud de la distribución de la droga dentro de los tejidos también afecta la distribución sistémica; por ejemplo, cuanto mayor sea la amplitud de distribución de la droga dentro de los tejidos de los órganos, menor será su exposición en plasma. Pudo ser calculado de los datos de dosis intravenosa de catequinas, que el volumen de distribución estimado es 3-10 veces mayor que el correspondiente volumen central de distribución, sugiriendo para estos compuestos una alta penetración en tejidos. La diferencia de hidrofobicidad de las catequinas podría contribuir a los diferentes efectos biológicos y farmacológicos. Proponen que la mayoría de los polifenoles penetran la membrana celular cuando las reacciones de partición alcanzan el equilibrio (Yang CS y col., 2004). Otros trabajos, como el de Nie y colaboradores también describen la capacidad de las catequinas para atravesar la membrana plasmática. En este trabajo se menciona que las catequinas atraviesan la barrera hematoencefálica para ejercer sus efectos neuroprotectivos (Nie G y col., 2002). De todos modos debe mantenerse en perspectiva que aún con un bajo grado de biodisponibilidad, una alta penetración tisular podría muchas veces ser benéfica para ciertas propiedades terapéuticas.

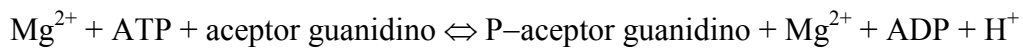
Dado que las catequinas exhiben una farmacocinética no-lineal, la biodisponibilidad oral es dependiente de los regímenes de dosis y vía de administración ó la composición de catequinas individuales en el extracto (Zhu M y col., 2000).

Otras de las razones de esta baja biodisponibilidad y/o ausencia de actividad comparada a los efectos *in vitro*, es la biotransformación que sufren estos compuestos como consecuencia de la actividad enzimática. Las catequinas del té son rápidamente metiladas, glucuroniladas, sulfatadas. Comparados con humanos, en ratones se observa mayor eficiencia en las transformaciones enzimáticas de las catequinas y en cambio, la EGCg en plasma en humanos, está mayormente presente en forma libre (Lee MJ y col, 2002; Meng X y col, 2002; Elbling y col, 2005).

## **8- ANTECEDENTES DEL LABORATORIO**

La participación de los aminoácidos y su rol determinante en el ciclo de vida de *T.cruzi* ha sido ampliamente demostrada y en nuestro laboratorio se ha trabajado intensamente en el metabolismo de la L-arginina. Teniendo en cuenta que uno de los destinos de este aminoácido básico es ser sustrato para la producción enzimática de óxido nítrico (NO), se identificó y caracterizó bioquímicamente una sintasa de NO soluble en epimastigotes de *T.cruzi* (Paveto C y col., 1995). La producción de NO en *T.cruzi* se ha correlacionado con la motilidad flagelar en ese estadio (Pereira C y col., 1997). A su vez, el grupo de trabajo del Dr. Radi en Uruguay ha propuesto otro rol, y es la inhibición del proceso de muerte celular programada debido a la L-arginina, precisamente a través de la producción de NO dependiente de la sintasa (Piacenza L y col., 2001).

Posteriormente, en nuestro laboratorio se logró caracterizar bioquímica y molecularmente una quinasa de arginina de *T.cruzi*, enzima importante en la transferencia de energía para el parásito tal como se ve en la ecuación general:



siendo el aceptor guanidino la L-arginina (Pereira CA y col., 2000). Esta quinasa de arginina pertenece a un grupo de proteínas evolutivamente conservadas agrupadas en una familia, las guanidino quinasas, está ampliamente distribuída taxonómicamente, existe en anélidos, celenterados, moluscos, cordados y artrópodos pero está ausente en mamíferos.

Se han aportado evidencias, también a través de trabajos realizados en nuestro laboratorio, que apoyan la regulación de la quinasa de arginina de *T.cruzi* por condiciones intra y extracelulares, tales como disponibilidad de nutrientes, densidad del cultivo medida como número de parásitos por mililitro, estado metabólico de los parásitos (Alonso GD y col., 2001). Otra evidencia de dicha regulación es la interrelación entre la actividad de la enzima, el transporte de L-arginina y el crecimiento celular del parásito (Pereira CA y col., 2002).

## **Introducción**

En tanto hemos demostrado la importancia de la existencia de la enzima en *T.cruzi* y teniendo en cuenta que esta ruta no existe en el hospedador mamífero, se puede proponer entonces como un interesante y posible blanco para el desarrollo y/o búsqueda de nuevas drogas. A este respecto, existen antecedentes en la bibliografía especializada, que describen un mecanismo de defensa de plantas, contra el ataque del insecto predador *Manduca sexta* (Rosenthal GA y col., 1977). Esa defensa radica en un metabolito vegetal soluble, el aminoácido canavanina, inhibidor competitivo de la quinasa de arginina. Inspirados en ese hallazgo y en la ancestral y siempre vigente tarea de identificar compuestos activos en las plantas, se ensayaron diversos extractos vegetales sobre la actividad de la quinasa de arginina de *T. cruzi* parcialmente purificada.

El extracto acuoso y la fracción de acetato de etilo resultante de un fraccionamiento del té verde de *C. sinensis*, disminuyeron significativamente la actividad de la enzima en el extracto soluble de *T. cruzi* con una  $IC_{50}$  de 20  $\mu\text{g/ml}$  para el té verde y 10  $\mu\text{g/ml}$  para el acetato de etilo.

De acuerdo a estos resultados, se centró el interés en estudiar la actividad biológica del extracto de té verde sobre *T. cruzi*.

Experimentos realizados sobre tripomastigotes sanguíneos mostraron que el extracto genera la lisis del 90% de los tripomastigotes sanguíneos a una concentración de 2 mg/ml.

## **9- OBJETIVOS DE TRABAJO**

Teniendo en cuenta datos previos del laboratorio, la ausencia de antecedentes sobre la actividad anti-*T. cruzi* del extracto acuoso del té verde de *C. sinensis*, y sabiendo la necesidad de nuevos compuestos para el desarrollo de una quimioterapia para la enfermedad de Chagas; el **objetivo general** del trabajo fue:

*- Identificar y caracterizar el ó los componentes del té verde de C. sinensis con actividad tripanocida.*

Y los **objetivos particulares**:

*- Identificar el ó los compuestos activos sobre la forma tripomastigote de T. cruzi.*

*- Caracterizar la actividad tripanocida del mismo sobre los estadios de epimastigote y amastigote del parásito*

*- Determinar su actividad **in vivo** en modelos murinos de la enfermedad de Chagas*

*- Determinar el mecanismo de acción del compuesto.*

# ***Materiales y Métodos***

## **1- Reactivos**

El Sephadex LH-20 fue obtenido en Amersham Pharmacia (Little Chalfont, Reino Unido); la placa delgada de cromatografía de sílica gel, los solventes orgánicos y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en Merck Chemicals (Darmstadt, Alemania), el líquido de centelleo Gold x R en Packard Instrument Co., la resina Dowex AG-1 x 4 (mesh 200-400), como el reactivo de Bradford fueron de Bio Rad; L-[2,3-<sup>3</sup>H] arginina fue de DuPont/NEN (New England Nuclear). Los medios de cultivo de parásitos fueron preparados con drogas Difco, Co., y los de cultivos celulares fueron de Gibco, Rockville, MD. Marcadores de peso molecular: se utilizaron el 50 bp y el 1 Kb de New England Biolabs. El DeadEnd<sup>TM</sup> Fluorometric TUNEL System y el Celltiter 96<sup>®</sup>AQ<sub>ueous</sub> Non- Radioactive Cell Proliferation Assay y el reactivo de Griess fueron de Promega (Madison, Estados Unidos). Las catequinas, el polifenón 60 y los reactivos restantes fueron obtenidos de Sigma Aldrich.

## **2- Aparatos y equipos**

Para las extracciones líquido/líquido se utilizó un extractor para disolvente liviano tipo Kutscher-Steudel.

Los geles de DNA se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador de luz UV Pharmacia Botech. Image Master<sup>®</sup> VDS.

Para el recuento de células Vero infectadas con amastigotes, y observación de fluorescencia de epimastigotes, se utilizó un microscopio de fluorescencia Leica LB con diferentes filtros, según la necesidad de cada caso.

Para la observación y recuento de células, se utilizó un microscopio LEITZ LABOR LUX con contraste de fase con una magnificación de 400X.

Para la determinación de proteínas y medición de absorbancia se utilizó un lector Merck Sensident Scan.

HPLC Agilent 1100 con DAD y FLD.

Cromatógrafo gaseoso HP 5890 con detector 5972.



### **3- Material vegetal**

Las hojas secas de té verde de *C. sinensis* (L) O. Kuntze (Theaceae) se obtuvieron en Droguería Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina.

### **4- Extractos y fracciones**

Los extractos y fracciones fueron resuspendidos en etanol-agua (1:1), guardados a -20°C y protegidos de la luz.

### **5- Preparación de catequinas**

Las catequinas comerciales se disolvieron en agua destilada estéril, en etanol: agua (1:1), o en medio de cultivo, según el experimento. En todos los casos se prepararon en el momento de uso protegidas de la luz y el calor. Las soluciones madres se guardaron por un máximo de 4 días en solución etanólica a -20 °C.

### **6- Parásitos**

#### *6.1- Epimastigotes*

Epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuén, stock Tul 2, fueron cedidos por el Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén (INP). Los cultivos fueron crecidos en medio axénico LIT hasta fase exponencial temprana, por medio de pasajes semanales (Wynne de Martini GJ y col., 1980).

#### *6.2- Tripomastigotes sanguíneos*

Los tripomastigotes sanguíneos de la misma cepa fueron mantenidos por pasajes seriados en ratones BALB/c inoculando  $5 \times 10^4$  tripomastigotes vía intraperitoneal (i.p.) por personal del INP. Los animales se sacrificaron mediante anestesia con éter etílico en el pico de parasitemia y se obtuvo sangre por punción cardíaca, utilizando heparina como anticoagulante. Luego

de la dilución (1/500) de la alícuota de sangre obtenida en medio BHI, se realiza el recuento de parásitos en cámara de Mallassez.

### ***6.3- Tripomastigotes de cultivo***

Los tripomastigotes de cultivo cepa CL- Brener, fueron obtenidos y mantenidos por infección de cultivos de células Vero. Los tripomastigotes se adicionaron a monocapas de células Vero no confluentes en medio RPMI 5% SFB y mantenidos durante 5-7 días a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> con recambio de medio cada 48 horas. El sobrenadante con tripomastigotes se centrifugó a 230 rpm durante 10 min y el precipitado se resuspendió en 0,5 ml del cual se realizaron diluciones para contar en cámara de Neubauer.

## **7- Recuento de células**

El recuento de epimastigotes, células Vero y macrófagos viables se realizó con el colorante de exclusión azul de tripano. Para ello se sembró en la cámara de Neubauer una mezcla de volúmenes iguales de suspensión celular y de colorante al 0.4%.

El recuento de tripomastigotes de cultivo, se realizó sembrando 10 µl de la suspensión en la cámara de Neubauer por observación al microscopio óptico. Se contaron sólo los tripomastigotes móviles.

En los ensayos de actividad tripanocida *in vitro* sobre tripomastigotes sanguíneos y controles de parasitemia de los experimentos *in vivo*, el recuento de tripomastigotes sanguíneos se realizó por observación directa al microscopio según describe Brener (Brener Z, 1962). Se agregaron 5µl de la muestra sobre un portaobjeto y se cubrió con un cubre objeto de 18 x 18 cm. Se contaron los parásitos presentes en 50 campos tomados al azar utilizando un aumento de 400 x.

## **8- Animales**

Se utilizaron ratones BALB/c machos de 55-60 días criados y mantenidos en el INP. Se mantuvieron en el bioterio a temperatura ambiente de 25±2 °C,

humedad relativa de 70±10%. Los ratones a razón de 5 por caja fueron alimentados con alimento Cooperativa, y agua *ad libitum*.

## **9- Cultivos Celulares**

### *9.1- Línea de cultivo de células Vero*

Se trabajó con la línea celular continua Vero (derivada de células de riñón de mono verde africano). Las células se mantuvieron en medio RPMI 5% SFB con pasajes cada 72 horas en botellas de 75 cm<sup>2</sup> según se describe: luego de lavar las células con buffer fosfato (PBS) estéril se despegaron con 2-3 ml. de una solución de tripsina 0.02%. La acción de la tripsina se detuvo agregando 3 ml de medio, centrifugando durante 10 min a 800 rpm y agregando 10 ml de medio RPMI 5 % SFB. Se sembraron 2 ml de la suspensión celular en botellas nuevas con el agregado de 8 ml de medio y se mantuvieron a 37°C 5% CO<sub>2</sub>.

### *9.2- Cultivo primario de macrófagos murinos*

La producción de macrófagos en ratones machos y hembras BALB/c se estimuló con una solución de tioglicolato al 3% administrada intraperitonealmente. Los cultivos primarios de macrófagos fueron obtenidos de peritoneo, luego del sacrificio de los ratones por dislocación cervical, bajo el efecto de una leve anestesia con éter (Dra. Miriam Postan del INP).

### *9.3- Fijación y tinción de células*

Se retiró el medio de las células y se lavaron 3-4 veces suavemente con PBS estéril. Se dejaron secar y se fijaron por inmersión en metanol 100% durante 10 min. Se retiró el metanol y una vez secas se tiñeron con una solución de Giemsa durante 10-15 min a temperatura ambiente. Se lavó el colorante con agua, y las laminillas fueron colocadas invertidas sobre portaobjetos con montaje de Permout para su visualización y recuento al microscopio óptico.

#### *9.4- Recuento de células infectadas*

El número de células infectadas fue determinado por la observación de 300 células de cada pocillo. El porcentaje de inhibición de infección ó proliferación de amastigotes fue calculado teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Células control infectadas}-\text{Células experimentales infectadas}}{\text{Células control infectadas}} \times 100$$

#### **10- Determinación de proteínas**

Se determinó mediante un micrométodo adaptado del protocolo original descrito por Bradford (Bradford MM, 1976). A 20 µl de cada muestra se le agregaron 200 µl del reactivo de Bradford (Bio Rad). Las muestras se analizaron por duplicado en placas de 96 pocillos, y se midió DO a 595nm. Se utilizaron patrones de BSA (0,075-1mg/ml) para la construcción de una curva de calibración.

#### **11- Extracción del material vegetal**

Se inició el fraccionamiento de los componentes del té verde de *C. sinensis* a partir de un extracto acuoso 10 % P/V preparado en caliente con 100 gramos de hojas secas no fermentadas, trituradas y hervidas en 1 litro de agua durante 10 min.

#### **12- Fraccionamiento bioguiado de los extractos activos del té verde de *C. sinensis*.**

Luego de enfriada y filtrada la muestra se descartó el precipitado (F2) y a partir del extracto acuoso (F1) se realizó un fraccionamiento líquido /líquido con solventes orgánicos de polaridad creciente: diclorometano, éter etílico, acetato de etilo. Los extractos orgánicos resultantes (F3, F4 y F5) se llevaron a

sequedad bajo vacío en un evaporador rotatorio, se resuspendieron a 50 mg/ml (5% P/V) en etanol-agua (1:1) y se ensayó la actividad inhibitoria sobre tripomastigotes sanguíneos.

### **13- Su-fraccionamiento de la F5**

Los componentes de la F5 se separaron a través de cromatografía en columna (CC) de Sephadex LH-20 (24 por 2 cm). Se sembraron 300 mg de la muestra y ésta se eluyó con metanol (MeOH) 100%. De la misma se obtuvieron 62 fracciones de 10 ml cada una, las cuales se llevaron a sequedad, y el residuo se resuspendió en etanol-agua (1:1). Se ensayó la bioactividad de cada una de ellas sobre tripomastigotes sanguíneos a concentraciones de 20, 2, 0.2 mg/ml (2, 0.2 y 0.02 % P/V).

### **14- Análisis de los componentes de las fracciones de la cromatografía en columna.**

La composición de cada fracción proveniente de la columna de Sephadex, fue analizada por cromatografía en capa delgada (TLC) sobre placas de sílica (sílica gel 60 F<sub>254</sub>). El desarrollo de la corrida se realizó con agua-diclorometano-metanol-butanona (1:8:4:3,5) utilizando catequinas comerciales como estándares según describió Bohm BA (Bohm BA, 1998). Se sembraron sobre la placa 2 µl de cada fracción al 2% y de solución 10 mM de catequinas estandares La observación de los cromatogramas se realizó con luz visible y luz UV a 254 nm.

### **15- Caracterización de catequinas.**

Las fracciones 16 a 40 provenientes de la columna de Sephadex LH-20 se juntaron y el conjunto se sometió a una cromatografía de alta resolución (HPLC). Se inyectó la muestra en una columna Hypersyl C<sub>18</sub> (octil decil silano) de 125 por 4 mm (5µm) como fase fija y metanol (CH<sub>3</sub>OH): ácido fosfórico 0,02M (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (25:75) como fase móvil. Las condiciones de la

cromatografía fueron las siguientes: rango de flujo, 1 min/ml; longitud de onda de detección, 280 nm. El espectro UV de cada pico eluído se realizó utilizando un detector de diodo (DAD).

También se realizó la caracterización de los componentes de la F16-40 por cromatografía gaseosa en el centro de identificación de compuestos orgánicos (CIC Srl.)

## **16- Actividad tripanocida en ensayos *in vitro***

### **16.1- Ensayo sobre tripomastigotes sanguíneos**

Se utilizaron tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén, stock Tul 2, mantenida por pasajes vía i.p. seriados en ratones BALB/c. La sangre se diluyó hasta obtener una concentración de  $5 \cdot 10^5$  parásitos/ml en medio BHI, y 90  $\mu$ l del mismo se sembraron en cada pocillo de una placa de 96. A cada pocillo se le agregaron 10 $\mu$ l de la sustancia a ensayar: extractos crudos, fracciones provenientes de la columna de Sephadex LH-20 ó catequinas comerciales. Las mezclas fueron incubadas durante 24 hs a 4°C. Al control se le agregó 10  $\mu$ l de medio y se realizó un control de diluyente al que se le agregó 10  $\mu$ l de etanol-agua (1:1) ó agua según el experimento. Los resultados se expresan como la mínima concentración inhibitoria (IC) de una fracción o compuesto necesario para matar el 50% (IC<sub>50</sub>) o el 90% (IC<sub>90</sub>) de los tripomastigotes presentes en la muestra. En cada experimento se agregó un control positivo de lisis con Benznidazol (40  $\mu$ g/ml = 150  $\mu$ M) (Esteva M y col, 2002).

### **16.2- Ensayos sobre amastigotes**

#### ***16.2.1- Inhibición de la infección***

##### *16.2.1.A - Línea celular Vero*

Se cultivaron  $5 \times 10^3$  células Vero sobre laminillas, en microplacas de 24 pocillos durante 24 horas, para permitir la adhesión y crecimiento de las

células. Luego se infectaron con tripomastigotes de cultivo en una relación de 10 parásitos por célula y se agregaron 10 µl de distintas concentraciones de EGCg ó GCg por duplicado en un volumen final de 500 µl.

Se dejaron pocillos con los parásitos a los que sólo se les agregó medio como controles de infección. Luego de incubar las células durante 2 horas, se lavaron con PBS hasta eliminar los tripomastigotes no adheridos y la droga. Se agregó medio y se incubaron por 48 hs para permitir la proliferación de los parásitos y determinar la infectividad frente al tratamiento con EGCg ó GCg. Paralelamente se realizaron los mismos tratamientos en células sin infectar, como control de toxicidad de cada concentración de las drogas.

#### ***16.2.2.B - Cultivo primario de macrófagos***

Se sembraron  $3 \times 10^5$  macrófagos aislados de peritoneo de ratón sobre laminillas en placas de 24 pocillos. Se incubaron 24 horas en Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) 10% SFB. Los mismos se infectaron con  $3 \times 10^6$  tripomastigotes de cultivo durante 2 horas, y se lavaron con PBS hasta eliminar los tripomastigotes no adheridos. Las células se cubrieron con medio durante 24 hs con 10 µl de distintas concentraciones de EGCg en un volumen final de 500 µl. En los pocillos control se agregó el mismo volumen de medio. El mismo tratamiento se realizó sobre macrófagos sin infectar.

#### ***16.2.2 Ensayos de inhibición de la replicación***

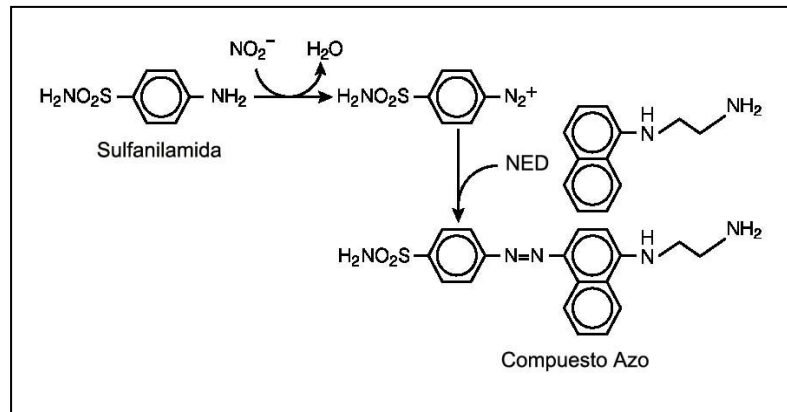
El ensayo se realizó sobre células Vero de la misma forma que el ensayo de inhibición de la penetración, pero en este caso la GCg y la EGCg fueron administrados luego de las 2 horas de infección y exhaustivo lavado de los tripomastigotes no adheridos, y se mantuvo la droga durante las 48 horas de incubación. También en estos experimentos se realizaron los controles de toxicidad de las distintas concentraciones de EGCg y GCg sobre células no infectadas y un control de infección al que sólo se le agregó medio.

**16.3- Determinación de óxido nítrico en cultivo primario de macrófagos**

Se realizó el mismo procedimiento del ensayo de inhibición de la infección de macrófagos, pero en células sin infectar, e incubadas durante 24 y 48 horas. Al término de cada incubación se tomó el sobrenadante de cada pocillo y se determinó la concentración de nitritos usando el ensayo de Griess, las células de las laminillas se descartaron.

La medición de óxido nítrico (NO) fue evaluada a través del contenido de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) en los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos, siendo el nitrito un producto final estable de la producción de NO. La detección se basa en la reacción entre el nitrito y la sulfanilamida, para luego reaccionar con el hidrocloreuro de N-1-naftilenediamina (NED) y formar el compuesto azo coloreado (**Figura 1**).

Brevemente, 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra fueron mezclados con 50  $\mu\text{l}$  del reactivo de Griess. Luego de 5-10 min de incubación a temperatura ambiente y en la oscuridad, se midió el valor de absorbancia de cada muestra a 550 nm. La concentración de nitritos fue estimada utilizando una curva estándar basada en diluciones seriadas de nitrito de sodio patrón.



**Figura 1:** Reacción química involucrada en la medición del  $\text{NO}_2^-$  en la reacción de Griess.



#### **16.4- Inhibición del crecimiento de Epimastigotes**

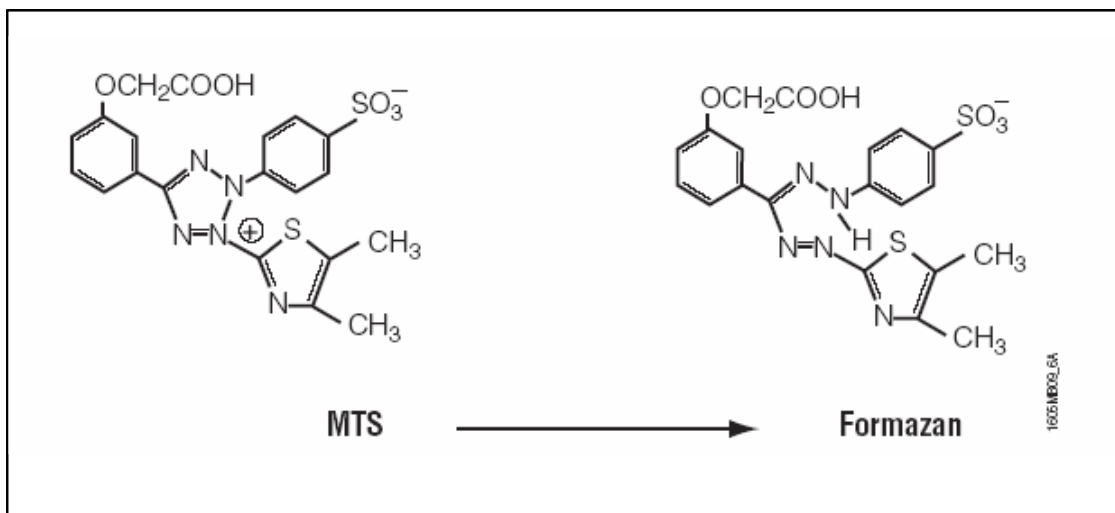
Se caracterizó la actividad tripanocida de la EGCg sobre epimastigotes de la cepa Tulahuen, stock Tul 2. Los parásitos se crecieron en medio LIT, a una densidad inicial de  $0.5 \times 10^6$  epimastigotes/ml y cuando la densidad de los mismos llegó  $2 \times 10^6$ /ml se sembraron alícuotas de 180  $\mu$ l en pocillos de una placa de 96 y se agregaron 20 $\mu$ l de EGCg a distintas concentraciones (volumen final = 200  $\mu$ l). El número de parásitos en cada muestra se determinó cada 24 horas durante 5 días contando en cámara de Neubauer. Con los datos del día 5 se calculó la IC<sub>50</sub> usando el software Prism del programa GraphPad. En cada experimento se utilizó Benznidazol (12  $\mu$ M) como control positivo de inhibición del crecimiento. Los experimentos se realizaron por duplicado y se repitieron tres veces.

#### **17- Ensayo de citotoxicidad de la EGCg *in vitro***

Se calculó la IC<sub>50</sub> con el método enzimático de MTS (bromuro de 3'(4,5 - dimetiltiliazol-2-il)-5, (3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), utilizando el Celltiter 96<sup>®</sup> AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Este es un método colorimétrico que mide el número de células viables en proliferación. Las deshidrogenasas de células metabólicamente activas, reducen el formazán disuelto en el medio de cultivo celular (**Figura 2**). La absorbancia del formazán puede ser leída directamente desde una placa de 96 pocillos a 490 nm y es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo.

Se sembraron  $5 \times 10^3$  células Vero por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se incubaron durante 24 horas a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>, para permitir su adherencia y crecimiento. Luego se les retiró el medio, y se cubrieron con MEM (minimal essential médium) 5% SFB con concentraciones crecientes de EGCg. Se las incubó durante 48 horas a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>. Las células se lavaron y se agregaron 15  $\mu$ l de solución de MTS en un volumen final de 200 $\mu$ l de MEM 5% SFB. Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> y se

midió absorbancia a 490 nm. Las células cultivadas en iguales condiciones, pero sin tratamiento, fueron utilizadas como control.



2. Estructuras del MTS y su producto formazán.

### 18- Ensayo de citotoxicidad de la EGCg *in vivo*

Dos grupos de ratones BALB/c (n=4) fueron tratados con 115  $\mu\text{g}$  (4,18 mg/kg/día) ó 458  $\mu\text{g}$  (16,3mg/kg/día) de EGCg respectivamente. La dosis se administró vía i.p., siendo la misma en forma diaria durante tres días. Finalizado el tratamiento, el 50% de los ratones de cada grupo fue sacrificado, y el sacrificio del 50% restante se realizó un mes después. Se incluyó un grupo control (n=2) al que se le administró agua a fin de observar si los daños que podría haber causado la droga son reversibles o no.

### 19- Actividad tripanocida en ensayos *in vivo*

Se ensayó el efecto tripanocida de la EGCg y Polifenón 60 sobre grupos de ratones BALB/c machos de 55-60 días infectados vía i.p. con 500 tripomastigotes de *T. cruzi*, recibiendo cada grupo (n=10) una concentración diferente de la droga resuspendida en agua. El tratamiento comenzó en todos los experimentos 30 min después de la infección y consistió en la administración de una o dos dosis diarias vía oral (v.o.) ó intraperitoneal de la

droga, según el ensayo, durante 45 días. La parasitemia se determinó por recuento de parásitos al microscopio óptico de muestras de sangre obtenidas de la cola.

En cada experimento se incluyó un grupo (n=5) de ratones infectados control que recibieron agua.

La droga fue preparada cada día en el momento de administración, siendo el volumen de administración de la misma y del diluyente (agua), de 100  $\mu$ l en los ensayos de administración i.p. y 20  $\mu$ l. en los de v.o.

Paralelo a cada experimento, se realizaron los mismos tratamientos a grupos de ratones sin infectar como control de toxicidad de la droga, siguiendo el modelo de sacrificio de ratones ya descrito en ensayos de toxicidad *in vivo*.

## **20- Estudios histopatológicos**

Los órganos del tracto digestivo, hígado y riñon de los ratones sin infectar y tratados con EGCg, Polifenón 60 y agua, fueron fijados en solución de formol 10% en PBS e incluidos en parafina. Se analizaron cortes de 5  $\mu$ m con tinción de hemoxilina-eosina (H&E) por la Dra. Alejandra Camino, investigadora asociada de la Universidad Austral.

## **21-Análisis estadístico**

El análisis de los datos se realizó aplicando el Análisis de la varianza de una cola (ANOVA) seguido del test de Dunnett. Se consideró  $p < 0.05$ , como estadísticamente significativo. Los valores de  $IC_{50}$  se calcularon por medio de análisis de regresión no lineal (Morrison DA, 2002).

El programa estadístico utilizado para los análisis mencionados fue Prism versión 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Calif. USA).

## **22- Ensayos de actividad de quinasa de arginina**

Se utilizó la quinasa de arginina recombinante de *T. cruzi*, expresada en *E. coli* y parcialmente purificada preparada en el laboratorio (Pereira CA y col, 2000). La actividad quinasa de arginina de *Trypanosoma cruzi* se ensayó por el método diseñado en el laboratorio por Pereira CA y col, 2000, en el cual se mide la conversión de arginina en fosfoarginina. La diferencia de carga entre ambas moléculas permite resolverlas en una resina de intercambio aniónico.

Los ensayos se realizaron utilizando una mezcla de reacción conteniendo ATP 2 mM, 2-Mercaptoetanol 10 mM, acetato de magnesio 5mM, L-[2,3-<sup>3</sup>H] arginina 1 mM (200.000 cpm x ensayo), HEPES 25 m pH 7.3 y 2-8 µg de fuente enzimática en un volumen final de 20 µl. Se incubó la reacción por 10 min a 30 °C y posteriormente se detuvo con 1ml de buffer de detención frío. Los productos de la reacción se resolvieron mediante el pasaje a través de 1 ml de resina Dowex AG 1-X4 (200-400 mesh) forma Cl<sup>-</sup> previamente equilibradas con 5 volúmenes de buffer de detención.

Luego de sembradas, las columnas se lavaron con 3 ml de buffer de ensayo y eluidas con 2 ml de solución de elución. La radioactividad se cuantificó en contador de centelleo líquido. La actividad inhibitoria de las catequinas fue ensayada por el agregado de las mismas a la mezcla de reacción.

## **23- Microscopía electrónica de tripomastigotes sanguíneos**

### *23.1- Obtención de tripomastigotes sanguíneos*

Ratones BALB/c infectados se sangraron por punción cardíaca. La sangre obtenida se volcó en un frasco con bolitas de vidrio y se realizaron movimientos circulares durante 10-15 min, hasta la formación del coágulo de fibrina. El sobrenadante se centrifugó a 800 rpm durante 10 min, se guardó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1/3 en medio BHI-SFB 5% y se volvió a centrifugar a 500 rpm durante 10 min a 20 °C. Se juntaron los dos sobrenadantes y se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min a 4 °C. El

precipitado se resuspendió en 200 µl de BHI y una alícuota se diluyó 1/1000 para contar tripomastigotes (Krettli, 1979).

### *23.2- Incubación de tripomastigotes sanguíneos con EGCg*

Se trataron  $1 \times 10^6$  tripomastigotes con 1nM de EGCg durante 15 y 60 min. Se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min y los precipitados se lavaron 2 veces con buffer de lavado por centrifugación a 5000 rpm durante 10-15 min. Los precipitados se resuspendieron en 200 µl de fijador y se incubaron a 4°C durante 2 horas. Se centrifugaron 5 min a 5000 rpm y el precipitado se guardó a 4°C con buffer de fijación.

La preparación y análisis de las muestras se realizó en el Servicio *ad hoc* de microscopía electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Buenos Aires.

## **24- Muerte celular programada**

### *24.1- Observación de fluorescencia de extremos OH 3' de ADN fragmentado*

Utilizamos el DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, el cual mide los fragmentos de ADN de células apoptóticas por incorporación catalítica de fluoresceína-12UTP al OH 3'- terminal del ADN usando la enzima recombinante Deoxinucleotidil Transferasa Terminal (rTdT). La fluorescencia del DNA 12-UTP marcado puede ser visualizada tanto por microscopía de fluorescencia o cuantificado por citometría de flujo.

**Preparación de los epimastigotes:** Se repicaron 300 ml de  $0.5 \times 10^6$  epimastigotes/ml en medio LIT y se dejaron crecer a 28 °C hasta que alcanzaron una concentración de  $2 \times 10^6$  epimastigotes/ml. Se tomaron alícuotas de 30 ml de la suspensión ( $6 \times 10^7$  epimastigotes totales) y se realizaron los tratamientos de inducción apoptótica: 10% de suero humano fresco (10% SHF) y 10% suero humano fresco inactivado (10% SHFI) durante 24 horas; y 2 mM EGCg durante 48 horas. Luego del tratamiento se contaron los parásitos en cámara de Neubauer, junto al control de epimastigotes sin tratar, y la misma cantidad de células se centrifugaron a 2.300 rpm durante 10

min para remover el medio de cultivo. Los parásitos se lavaron con PBS por centrifugación y se resuspendieron en 300µl de PBS hasta  $2 \times 10^8$  epimastigotes /ml. Se distribuyeron 100 µl de cada tratamiento sobre los portaobjetos cubiertos con poly-L-lisina.

### **Titulación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Se determinó el título del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> midiendo absorbancia a 240 nm de una dilución 1/1000 de la solución original; el valor del título se calculó según la siguiente fórmula:

*Título H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*: valor de la absorbancia/factor de dilución x 40 M<sup>-1</sup>

### **Preparación e inactivación del suero humano**

Se dejó coagular la sangre durante 2 horas a 37°C en posición de 45°. Se centrifugó a 2.000 rpm durante 3 min, se descartó el precipitado y se volvió a centrifugar a 2.300 rpm durante 5 min. El suero se inactivó a 56°C durante 30 min.

### **Preparación de los portaobjetos**

Se recubrió la superficie de los portaobjetos a utilizar con una fina capa de solución 0.01% (P/V) de poly-L-lisina en agua. Se dejaron secar a temperatura ambiente e inmediatamente después se realizaron 6 lavados con PBS 1X. Una vez secos se guardaron a temperatura ambiente hasta su uso.

### **Detección de fluorescencia:**

Se fijaron los parásitos sumergiendo los portaobjetos en una solución de formaldehído 4% durante 25 min a 4°C y se lavaron 2 veces con PBS durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se permeabilizaron por inmersión de los portaobjetos 5 min en una solución 0.2% de Tritón<sup>®</sup> X-100 y se lavaron los portaobjetos dos veces en PBS, 5 min a temperatura ambiente.

Se removió el exceso de líquido y se cubrieron los portaobjetos con 100 µl de Buffer de Equilibrio durante 5-10 min a temperatura ambiente.

Finalmente se agregaron 50 µl del Buffer de incubación rTdT en un área de 5cm<sup>2</sup> evitando que se sequen las muestras.

A partir de este momento se trabajó en oscuridad.

**Controles Negativos:** Se preparó un buffer de incubación sin la enzima rTdT y se agregó a un preparado de epimastigotes sin tratar.

**Controles Positivos:** Se agregaron 100 µl del Buffer DNasa I y se incubaron a temperatura ambiente, 5 min. Se eliminó el líquido y se agregaron 100 µl de Buffer DNasa I conteniendo 5.5-10 unidades/ml de DNasa I. Se incubaron 10 min a temperatura ambiente, se eliminó el líquido y se lavaron las muestras 3-4 veces con H<sub>2</sub>O deionizada y se realizó la reacción enzimática como se mencionó anteriormente.

Se cubrieron los preparados con cubreobjetos plásticos para asegurar una buena distribución del reactivo y se incubaron las muestras en una cámara húmeda protegida de la luz, a 37 °C.

Luego de 60 min se retiraron los cubreobjetos plásticos y se detuvo la reacción sumergiendo los preparados en SSC 1X a temperatura ambiente durante 15 min. Se lavaron los preparados 3 veces para eliminar la fluoresceína-12-UTP no incorporada y se tiñeron las muestras por inmersión de los preparados en una solución 1µg/ml fresca de DAPI a temperatura ambiente durante 5 min.

Se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O deionizada a temperatura ambiente 5 min, eliminando luego el exceso de H<sub>2</sub>O y se cubrieron los preparados con un cubreobjetos. Finalmente se analizaron las muestras en un microscopio de fluorescencia con un filtro de 520 nm para ver la fluoresceína y uno de 460 nm para DAPI.

#### *24.2- Fragmentación oligosomal del ADN*

Se analizó la fragmentación de ADN según el método descrito por Piacenza L y col, 2002. Se incubaron epimastigotes en medio LIT a 28°C en presencia de 10% suero humano fresco (SHF), 10% suero humano fresco inactivado (SHFI), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM durante 24 horas y 2 mM de EGCg durante 48 horas. Se recolectaron 3x10<sup>8</sup> parásitos de cada condición por centrifugación a 2.300 rpm durante 5 min. Se resuspendieron los precipitados en 0.5 ml de Buffer de lisis TET y se dejaron 15 min en hielo. El precipitado (cromatina intacta), se separó de los fragmentos pequeños de ADN por centrifugación a 4°C durante 45 min

a 13.000 rpm. Los fragmentos de ADN fueron precipitados con 5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  1M, 100  $\mu$ l de NaCl 5 M, y 1 ml de alcohol isopropílico durante toda la noche a  $-20^\circ C$  y colectados por centrifugación a  $4^\circ C$  durante 45 min a 13.000 rpm y los precipitados se dejaron secar a temperatura ambiente. Las muestras de ADN se resuspendieron en 30  $\mu$ l de buffer TE. Las muestras de ADN se incubaron con 100 $\mu$ g/ml de RNasa a  $37^\circ C$  durante 2 horas y posteriormente con 100  $\mu$ g/ml de proteinasa K a  $37^\circ C$  durante 1 hora. Finalmente se sembraron en un gel de agarosa 2% conteniendo 1 $\mu$ l de bromuro de etidio por cada 50 ml de gel; con solución de siembra sin colorantes y los fragmentos se separaron electroforéticamente durante 1:30 horas a 80 voltios.

## **25- Medios, buffers y soluciones generales**

### **LIT (1 litro)** (triptosa de infusión de hígado)

Disolver 5 gr de infusión de hígado, 5 gr de triptosa, 68 ml de 1M NaCl, 5.3 ml 1M KCl, 22 ml de 1M  $HPO_4Na_2$ . Autoclavar. Agregar 10 ml 20% glucosa, 1 ml hemina (1gr en 50 ml 0.2M NaOH), 10% SFB (10% final), 100  $\mu$ g/ml estreptomycin y 100 U/ml penicilina.

### **BHI**

Infusión cerebro-corazón 37 g/l. Autoclavar

### **PBS 1 X**

137 mM Na Cl

2.7 mM KCl

1.5 mM  $KH_2PO_4$

8 mM  $Na_2HPO_4$



**Buffers para el ensayo de quinasa de arginina**

*Buffer de detención*

25 mM buffer HEPES, pH 7.3

10 mM L-arginina

5 mM EDTA

*Buffer de ensayo*

25 mM buffer HEPES, pH 7.3

*Buffer de elución*

NaCl 1M

Hcl 0.1N

**Buffer de lisis TET(Tris-EDTA-Tritón)**

10 mM Tris/HCL pH 8.0

1mM EDTA

0.5% (p/v) Tritón X-100

**Buffer TE (Tris EDTA)**

10mM Tris/HCl pH 8.0

1mM EDTA

**TBE 5X (Tris- Borato -EDTA)**

54g/l Tris

27.5 g/l ácido bórico

20 ml 0.5M EDTA (pH 8.0)

**Formaldehido 4%**

6.25 ml formaldehído 16%

100 ml PBS

pH 7.4

**Buffer de incubación rTdT (para una reacción)**

45 µl Buffer de Equilibrio  
5 µl Mezcla de nucleótidos  
1 µl de enzima rTdT

**Buffer de equilibrio**

200 mM cacodilato de potasio (pH 6.6 a 25°C)  
25 mM Tris-HCl (pH 6.6 a 25°C)  
0.2 mM DTT  
0.25 mg/ml BSA  
2.5 mM cloruro de cobalto

**Mezcla de nucleótidos**

50 µM fluoresceína-12-dUTP  
100 µM dATP  
10 µM Tris-HCl (pH 7.6)  
1 µM EDTA

**SSC 20X**

87.7 g NaCl  
44.1g Citrato de sodio  
400 ml de agua deionizada  
pH 7.2

**Solución de siembra para muestras de ADN 6X**

30% v/v glicerol

**Buffer Formol-PBS al 10%**

100 ml de formaldehído a 37 o 40 %  
900 ml de agua destilada  
4 g de sodio fosfato monobásico  
6.5 g de sodio fosfato dibásico (anhidro)

**Buffer de lavado**

0.1M buffer fosfato de sodio pH: 7.4

**Fijador**

0.25% de glutaraldehído

4% paraformaldehído (v/v en el buffer de lavado)

**Solución de tripsina (100 ml)**

Tripsina 0,25 %

EDTA 0,1 %

Llevar a volumen con PBS sin  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{Mg}^{++}$

**Giemsa**

Se prepara primero la solución madre: 1gr. de Giemsa; 66 ml de glicerina; 66 ml de metanol absoluto. Se deja estacionar un mes y se filtra.

La solución de trabajo de Giemsa se prepara en el siguiente orden: 1,25 ml de metanol absoluto; 1 ml de la solución madre; 40 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 %.

**Buffer H**

Buffer Hepes 25 mM pH: 7.3, suplementado con los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 0.5 mM; Leupeptina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; aprotinina 25 U/ml y 14 mM de 2-mercaptoetanol.

**Bromuro de Etidio**

10 mg/ml de Bromuro de Etidio en  $\text{H}_2\text{O}$ .

**EDTA 0,5 M pH:8**

**(250 ml)**

56,53 gr EDTA

117 ml de  $\text{H}_2\text{O}$

Llevar a pH 8 con NaOH 10 N

Completar con  $\text{H}_2\text{O}$

**Tris-HCl 1M pH 8**

**(1L)**

121 gr de Tris Base

700 ml de H<sub>2</sub>O

Llevar a pH 8 con HCl 5N

Completar con H<sub>2</sub>O

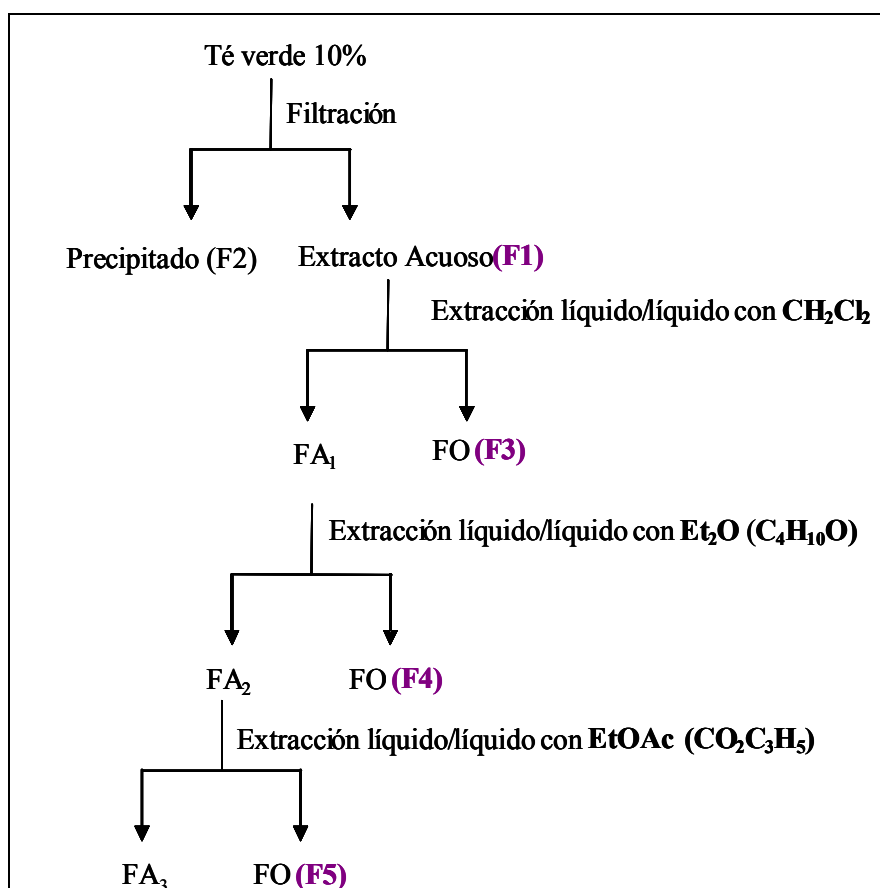
# *Resultados*

## 1- IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD TRIPANOCIDA A PARTIR DEL EXTRACTO ACUOSO DEL TÉ VERDE.

La extracción y purificación de los compuestos con actividad tripanocida se realizó a partir del extracto acuoso del té verde de *C. sinensis* mediante un procedimiento bioguiado utilizando el ensayo de actividad sobre tripomastigotes sanguíneos.

### 1.1- Fraccionamiento del extracto acuoso del té verde de *C. sinensis*

Del fraccionamiento del extracto acuoso de té verde de *C. sinensis* (F1) se obtuvieron 3 fases orgánicas a las que llamamos F3, F4 y F5 (**Figura 1**).



**Figura 1:** Esquema de la marcha de purificación bioguiada a través de ensayos de los extractos sobre tripomastigotes sanguíneos. FA: Fase acuosa. FO: Fase orgánica. F1: Fase acuosa de té verde. F2: Precipitado de la solución de té verde. F3: Fase orgánica de la extracción líquido-líquido de la F1 con dicloro-metano. F4: Fase orgánica de la extracción líquido-líquido de la FA<sub>1</sub> con éter etílico. F5: Fase orgánica de la extracción líquido-líquido de la FA<sub>2</sub> con acetato de etilo. FA<sub>3</sub>: Fase acuosa de la extracción líquido-líquido de la FA<sub>2</sub> con acetato de etilo

Como se mencionó en la introducción, el té verde obtenido de *C. sinensis*, contiene entre un 30-40 % de polifenoles, en su mayoría catequinas. Según el protocolo de purificación diseñado, concentrarían los compuestos polifenólicos del té verde en la fracción de acetato de etilo (Yung-Sheng L y col., 2003).

*1.1.1- Actividad tripanocida de extractos de té verde de C. sinensis*

De los ensayos de actividad realizados se obtuvieron los valores de concentraciones a los cuales tanto el extracto acuoso como las fracciones (F3, F4, F5) produjeron el 90% y el 50% de lisis respectivamente. Todos los extractos excepto la F3, mostraron actividad tripanocida a las concentraciones ensayadas, siendo la más activa la F5, con una IC<sub>50</sub> de 0,5 mg/ml. En esta última fracción, la actividad lítica sobre tripomastigotes sanguíneos, se concentró 4 veces con respecto a la actividad biológica observada en la F1.

**Tabla 1.**

Fracción	Lisis de tripomastigotes (mg/ml)	
	IC <sub>90</sub>	IC <sub>50</sub>
<b>F1</b>	2	1
<b>F3</b>	ND	ND
<b>F4</b>	10	4
<b>F5</b>	1	0,5
<b>FA<sub>3</sub></b>	ND	ND

**Tabla 1.** Valores correspondientes a la concentración tripanocida mínima del 50% y 90% (IC<sub>50</sub> y IC<sub>90</sub>), de los extractos resultantes de la extracción con distintos solventes orgánicos del extracto acuoso de *C. sinensis*. ND: No determinado. Se muestran los resultados de uno de cuatro experimentos. En todos ellos se utilizaron triplicados.

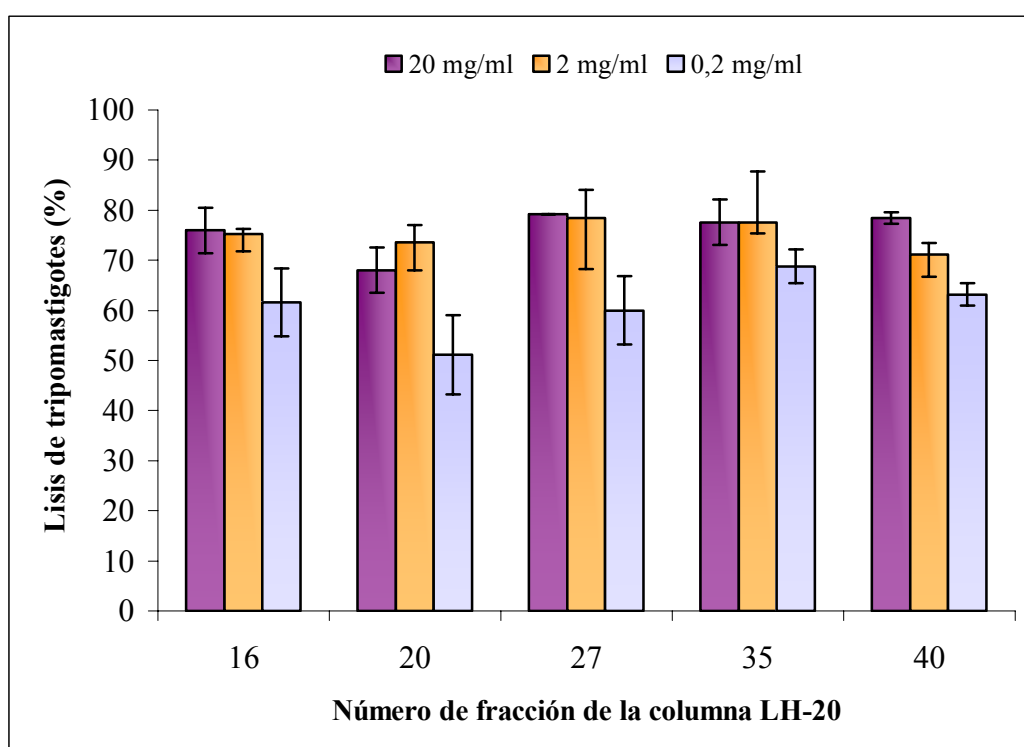
## 1.2- Sub-fraccionamiento de F5 por cromatografía en columna

Las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de Sephadex LH-20 se analizaron según su actividad biológica y composición química.

### 1.2.1- Actividad tripanocida de las fracciones obtenidas de la columna de LH-20

Cada una de las 62 fracciones resultantes fueron ensayadas sobre tripomastigotes sanguíneos a 20, 2 y 0,2 mg/ml (2, 0.2 y 0.02 % P/V) (**Figura2**).

Los resultados muestran que todas las fracciones poseen actividad tripanocida mayor o igual al 50%, aún en las concentraciones más bajas ensayadas.

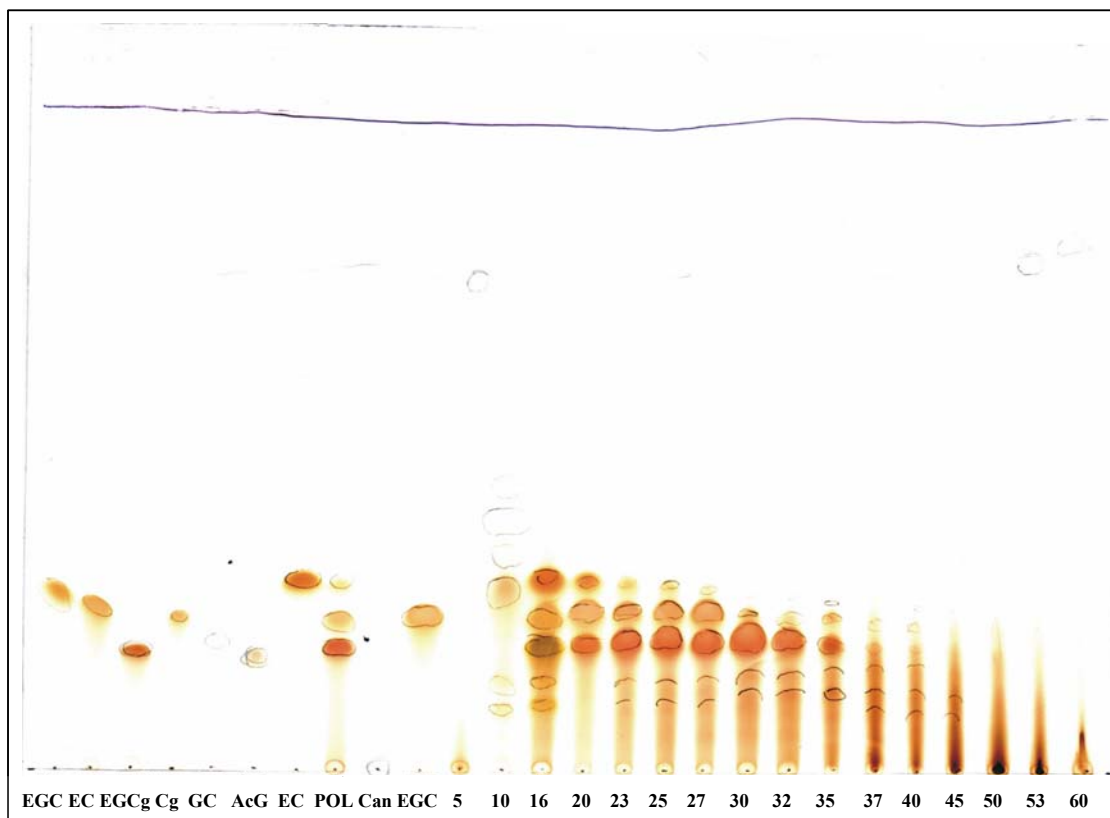


**Figura 2:** En la figura se muestra la actividad tripanocida de algunas de las fracciones provenientes de la columna de Sephadex. El resto de las fracciones ensayadas en experimentos independientes, mostraron resultados similares. Los resultados se expresan como la media de triplicados y sus desvíos estándares.



*1.2.2- Cromatografía en capa delgada de las fracciones de la F5*

Al sembrar las fracciones de la F5 en las placas de cromatografía se observó que desde la número 16 hasta la 40 contenían compuestos cuyos Rf coincidían con los estándares de catequinas comerciales utilizados (**Figura 3**).



**Figura 3:** Cromatografía en capa delgada (TLC) de algunas de las fracciones provenientes de la columna de Sephadex con los estándares de catequinas comerciales (EGC-EC-EGCg-Cg-GC-EC-EGC), ácido gálico (AcG) Polifenón 60 (POL), y el aminoácido canavanina (Can).

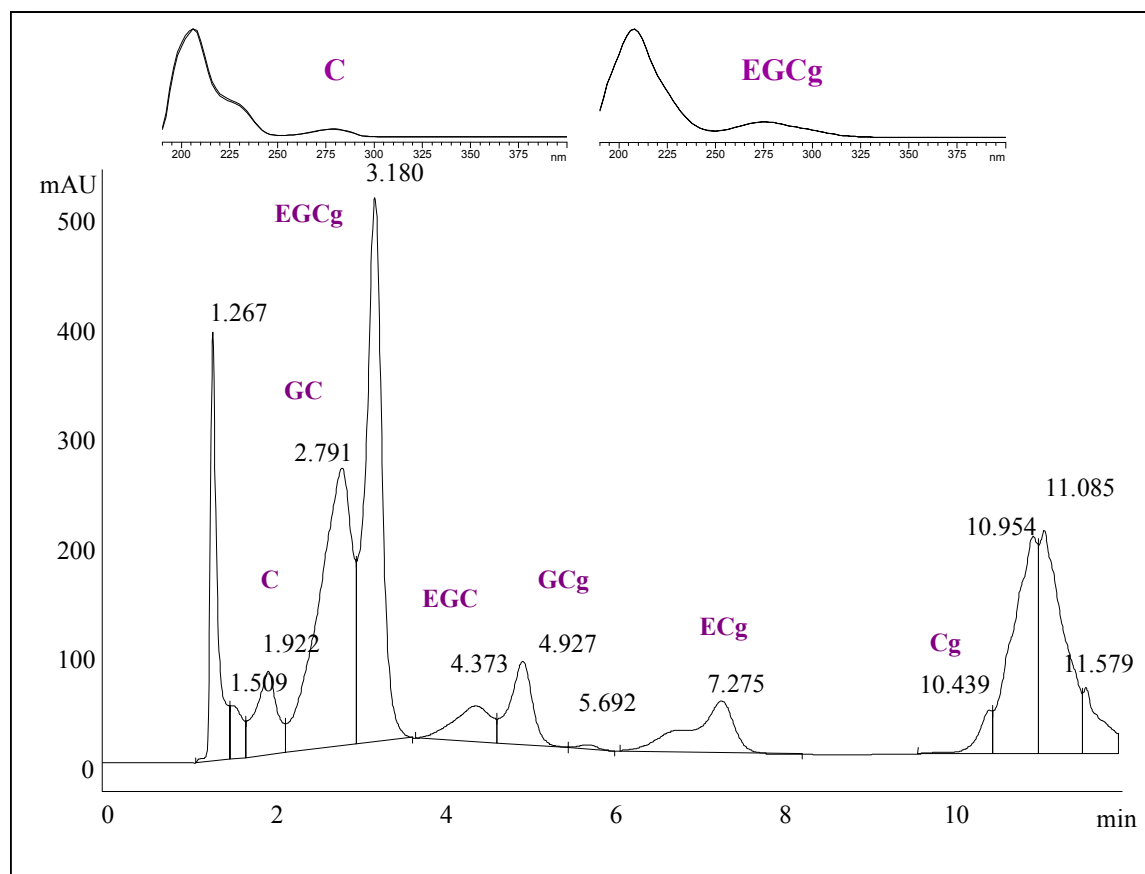
Dado que las fracciones 16 a 40 eran muy similares en actividad biológica y en diferentes grados ricas en catequinas, fueron reunidas y se denominó al conjunto F 16-40.

### 1.3- Caracterización de catequinas en la fracción F 16-40

La F16-40 fue sometida a HPLC analítico según se indicó en materiales y métodos.

El tiempo de retención (RT) de cada uno de los picos resultantes del extracto fraccionado por HPLC, junto al patrón de absorbancia de los mismos resueltos por el DAD, se compararon con los resultantes de las catequinas comerciales utilizadas como estándares.

De esta forma se caracterizaron las siguientes catequinas: C, GC, EGCg, EGC, GCg, ECg y Cg (**Figura 4, tabla 2**).



**Figura 4:** HPLC-DAD de la F 16-40. Se identificó cada catequina, según el tiempo de retención en la columna y el espectro de absorción comparado con los estándares de catequinas comerciales. Los insertos muestran a modo de ejemplo los espectros de absorción de la C y EGCg.

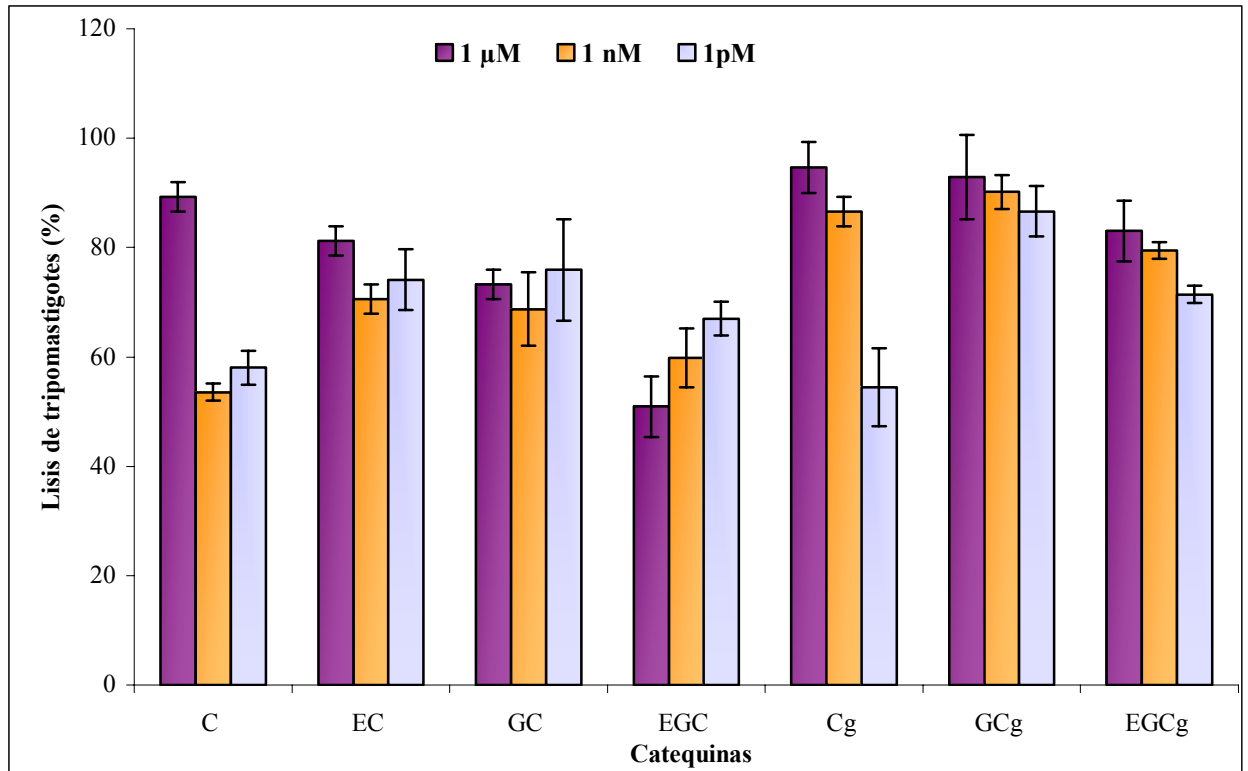
	Tiempo de retención de catequinas estándares	Tiempo de retención de catequinas caracterizadas con el HPLC-DAD
<b>C</b>	2.136	1.92
<b>GC</b>	2.24	2.797
<b>EGCg</b>	3.216	3.180
<b>EGC</b>	4.863	4.373
<b>GCg</b>	4.942	4.927
<b>EC</b>	5.223	ND
<b>ECg</b>	7.312	7.275
<b>Cg</b>	10.429	10.439

**Tabla 2:** Comparación de los tiempos de retención de las catequinas comerciales utilizadas como estándares y las catequinas caracterizadas por el HPLC-DAD. ND: No detectado.

Por medio de la cromatografía gaseosa se determinó en la muestra la presencia de C, EC, GC, EGC y residuos de ácido gálico.

### *1.3.1- Actividad tripanocida de las catequinas comerciales*

Verificamos la actividad tripanocida de todas las catequinas comerciales sobre tripomastigotes sanguíneos utilizando concentraciones de 1mM, 1  $\mu$ M y 1 nM. Las concentraciones más bajas de cualquiera de las catequinas causaron la lisis de al menos el 50% de los parásitos. Se encontraron variaciones en los valores de porcentaje de lisis correspondientes a cada concentración de catequinas obtenidos en diferentes experimentos; y en cada uno de ellos la dispersión respecto de la media es muy alta. En la **figura 5** se muestran los resultados de uno de los experimentos.



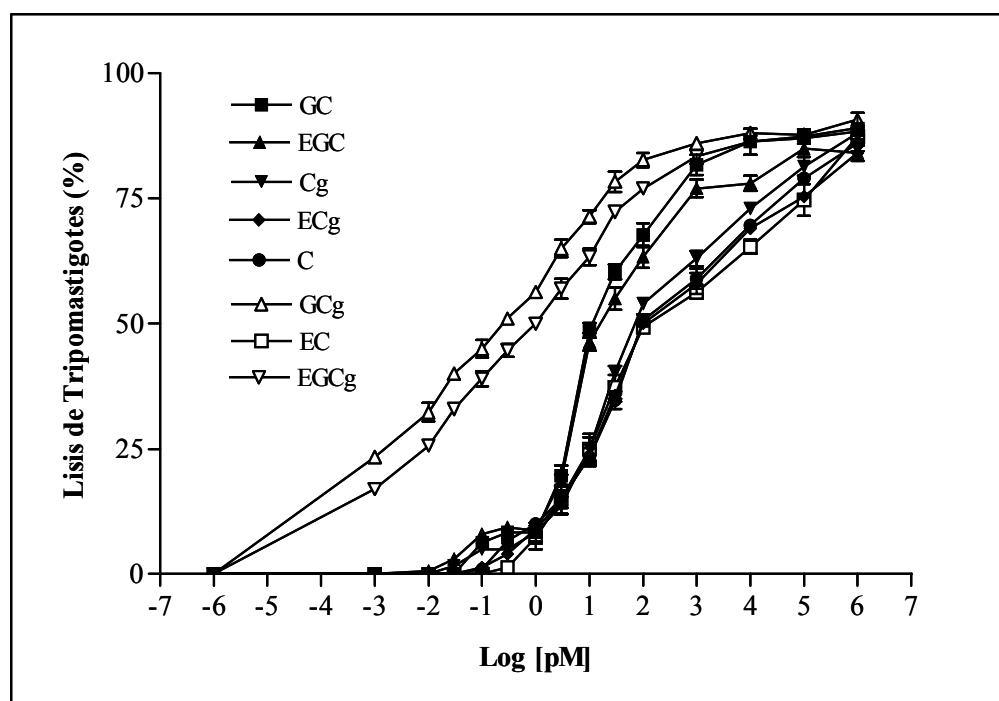
**Figura 5:** Porcentaje de lisis de tripomastigotes sanguíneos para las catequinas comerciales resuspendidas en etanol:agua (1:1) ensayadas a 1  $\mu$ M, 1 nM y 1 pM. (Volumen final de etanol en el ensayo 5%). Se realizaron tres experimentos. Cada barra representa la media de triplicados con sus correspondientes desvíos estándares.

## 2- CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DE LAS CATEQUINAS

### A- Ensayos *in vitro*

#### 2.A.1- Determinación de la IC<sub>50</sub> sobre tripomastigotes sanguíneos

De las curvas dosis-respuesta realizadas con concentraciones crecientes de cada catequina se obtuvieron los valores de IC<sub>50</sub> para cada compuesto resultando las más activas la EGCg y la GCg con valores de 0.12 y 0.53 pM respectivamente (**Figura 6 y tabla 3**). Las concentraciones a las cuales se logra el máximo efecto lítico (~ 90%) son entre 10 y 100 nM según el compuesto. No se observó lisis ni alteraciones morfológicas de los glóbulos rojos acompañantes con ninguna de las catequinas ensayadas hasta concentraciones de 1 mM.



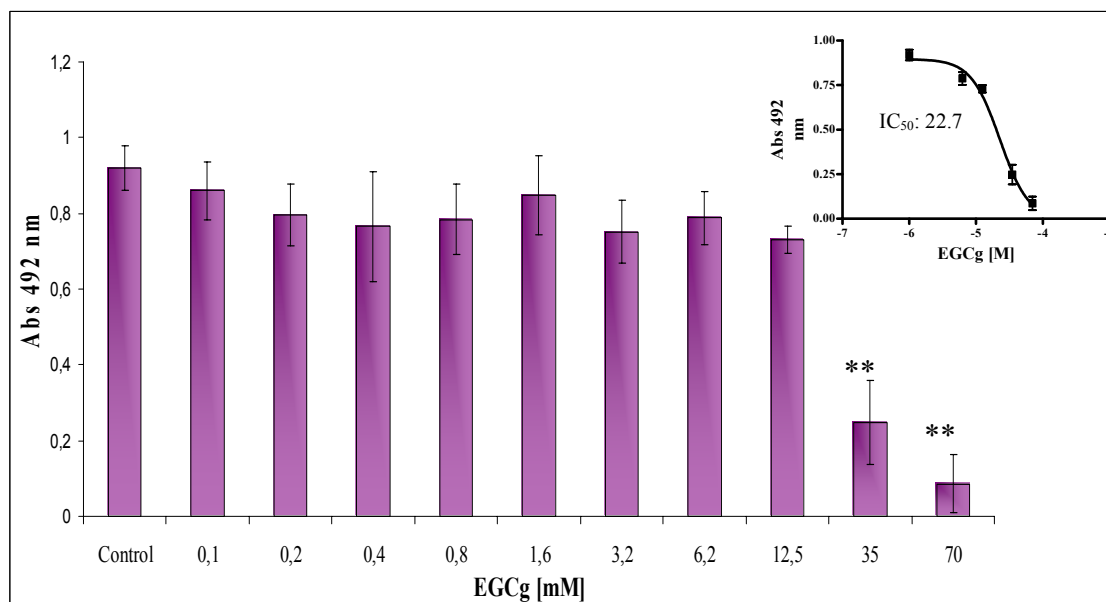
**Figura 6:** Efecto lítico dependiente de la dosis de las catequinas comerciales resuspendidas en agua sobre tripomastigotes sanguíneos. El control positivo de lisis se realizó con Bz en cada experimento (IC<sub>50 Bz</sub>: 150 μM).

Catequina	IC <sub>50</sub> (pM)
GCg.....	0.12
EGCg.....	0.53
GC.....	10.5
EGC.....	13
Cg.....	48
ECg.....	56
C.....	67
EC.....	85

**Tabla 3:** Efecto lítico de las catequinas comerciales sobre tripomastigotes sanguíneos. EGCg y GCg, las dos moléculas más activas, fueron seleccionadas para estudios posteriores

### 2.A.2- Toxicidad del EGCg sobre células Vero

El análisis del estado metabólico de las células incubadas con EGCg demostró que una dosis de 22.7  $\mu$ M disminuyó en un 50% la capacidad de reducir al MTS. A concentraciones menores a 12.5  $\mu$ M no se observaron diferencias significativas con respecto al control (**Figura 7**).



**Figura 7:** Efecto de la EGCg sobre la viabilidad de las células Vero. La misma se estimó mediante el ensayo de MTS luego del tratamiento de las células con distintas concentraciones de EGCg durante 48 horas. El experimento se repitió dos veces y los datos representan la media  $\pm$ SD; n= 4. \*\*P< 0,01

**2.A.3- Análisis de la actividad tripanocida sobre amastigotes**

*2.A.3.1- Infección y replicación en cultivos de células Vero*

Tanto la EGCg como la GCg causaron la disminución del número de células infectadas cuando fueron agregados en el momento de la infección del cultivo celular (2 hs), ó después de permitida la penetración del parásito. Los resultados resumidos en la **tabla 4**, muestran que las mencionadas catequinas son capaces de inhibir la replicación de la forma intracelular, así como de disminuir la capacidad de los tripomastigotes para infectar cultivos celulares. En ambos casos la respuesta fue dependiente de la dosis, y la concentración necesaria de cada catequina para lograr el 50% de los efectos descritos fue de aproximadamente 100 nM.

No se observaron modificaciones en el número y/o morfología de las células en los controles de toxicidad correspondientes a cada concentración de droga.

Compuesto	% de células infectadas	
	Simultáneo con la infección	2 hs. Post- infection
GCg [nM]		
5	66.00 ± 5.10 **	68.09 ± 3.55 ***
100	45.09 ± 2.57 ***	47.05 ± 4.04 ***
500	22.12 ± 3.04 ***	25.30 ± 1.72 ***
EGCg [nM]		
5	74.50 ± 6.98 *	73.70 ± 4.89 **
100	52.94 ± 0.76 ***	43.13 ± 4.14 ***
500	36.42 ± 2.15 ***	34.20 ± 1.00 ***

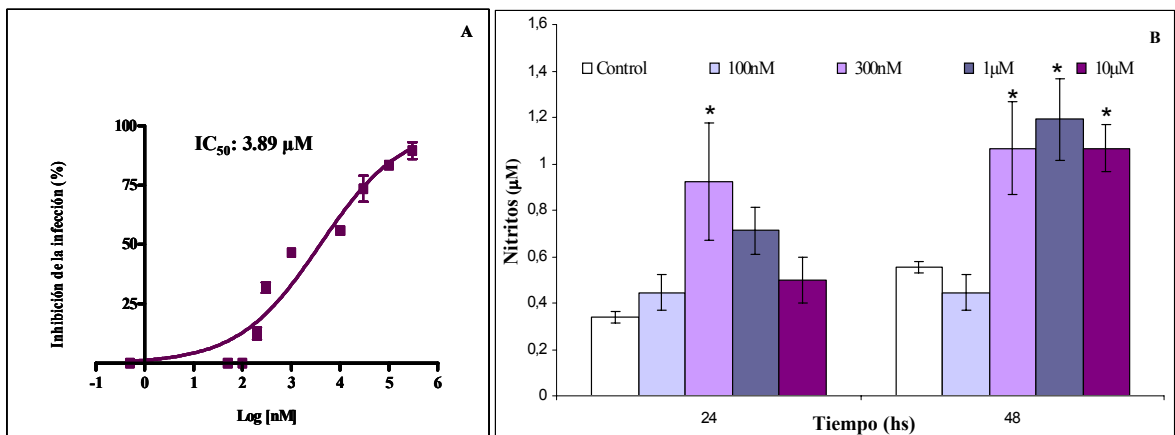
**Tabla 4:** Efecto de inhibición de la infección de células Vero por tripomastigotes y de inhibición de la replicación de amastigotes por catequinas comerciales. Cada valor está expresada como la media ± DE de tres determinaciones independientes. (\* p< 0.05; \*\* p< 0.01 ; \*\*\* p < 0.005 )

**2.A.3.2- Infección y replicación en cultivo primario de macrófagos. Efecto sobre la producción de nitritos.**

La infección de macrófagos intraperitoneales de ratones por tripomastigotes de cultivo disminuyó hasta un 50% con aproximadamente 4  $\mu\text{M}$  de EGCg (**Figura 8A**)

El óxido nítrico ha sido identificado en un primer momento como factor derivado del endotelio, mediador de la relajación y vasodilatación del músculo liso (Billiar T.R. y col., 1992) y como mensajero neuronal (Nussler, A.K. y col., 1993). Luego fue reconocido como una importante molécula reguladora del sistema inmunológico y como mediador citotóxico de las células efectoras activadas. Es por esto, que el siguiente paso fue determinar el efecto del EGCg sobre la producción de NO en macrófagos (**Figura 8B**).

Se observó que a las concentraciones que rodean el valor de la  $\text{IC}_{50}$ , la producción de óxido nítrico aumentó moderadamente a las 48 horas.



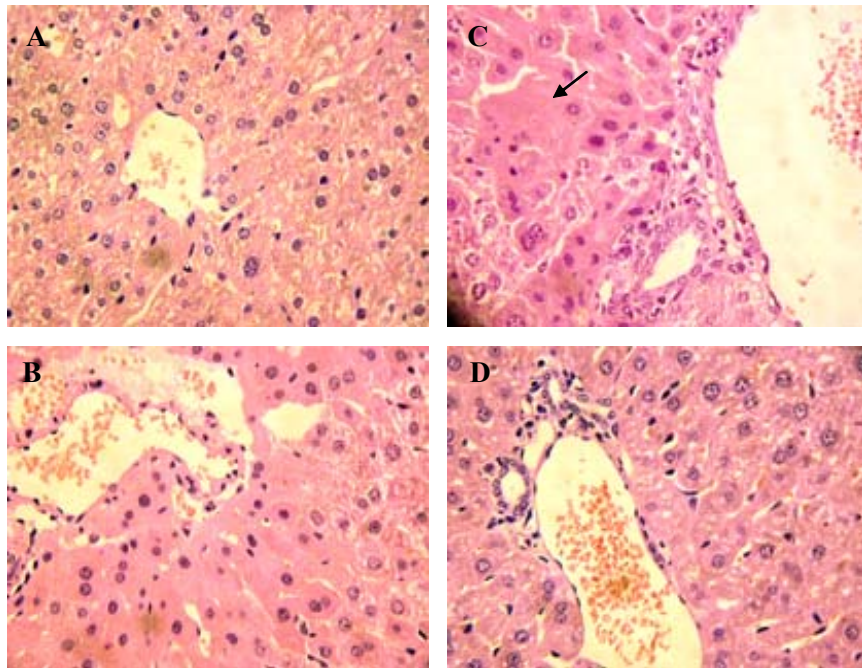
**Figura 8:** **A.** Curva de inhibición de la infección de cultivo primario de macrófagos murinos por *T. cruzi* con distintas concentraciones de EGCg. **B.** Producción de NO en sobrenadantes de cultivos primarios de macrófagos murinos a las 24 y 48 hs. Cada valor representa la media  $\pm$ SD de triplicados (\*  $p < 0.05$ ).



## **2.B - Ensayos *in vivo***

### **2.B.1- Ensayos de toxicidad de la EGCg en modelo murino**

Para establecer concentraciones de trabajo en un modelo experimental de ratones infectados, se ensayaron dos concentraciones de EGCg administradas por vía intraperitoneal durante tres días. Al día siguiente de finalizado el experimento se sacrificó el 50% de los animales. Para determinar la reversibilidad de los daños que pudiera ocasionar la droga, el resto de los ratones se sacrificaron un mes después. En los animales que recibieron 4,18 mg/kg/día de droga no se observó daño hepático alguno (**Figura 9B**) al igual que los controles tratados con el diluyente (**Figura 9A**). Por el contrario, los animales tratados con 16,3 mg/kg/día de droga (**Figura 9C**), presentaron injuria celular irreversible. Se observó necrosis hepatocelular como también características de regeneración celular (núcleos hipercromáticos y binucleación). Es bien conocida la capacidad del tejido hepático de ser reclutado al ciclo celular activo (Becker FF, 1970; Shea SM, 1964), en mayor medida en presencia de una noxa y presentar restitución *ad integrum* celular. Como observamos en la **figura 9D**, los ratones sacrificados un mes después de finalizado el tratamiento, no presentaban daño celular, con características similares a los animales control (**Figura9**).



**Figura 9:** Cortes de hígados de ratones tratados con EGCg. **A.** Control, 20x. **B** Ratones tratados con 4,18 mg/kg/día de EGCg sacrificado 24 horas posterior a terminar el tratamiento, 40x. **C** Ratones que recibieron 16,3 mg/kg/día de EGCg sacrificado 24 horas posterior a terminar el tratamiento, 40x; y **D** ratones sacrificados 30 días posterior a finalizar el ensayo, 40x. La flecha señala un foco de necrosis hepatocelular.

## **2.B.2- Ensayos de actividad tripanocida de la EGCg y Polifenón 60 en modelo murino**

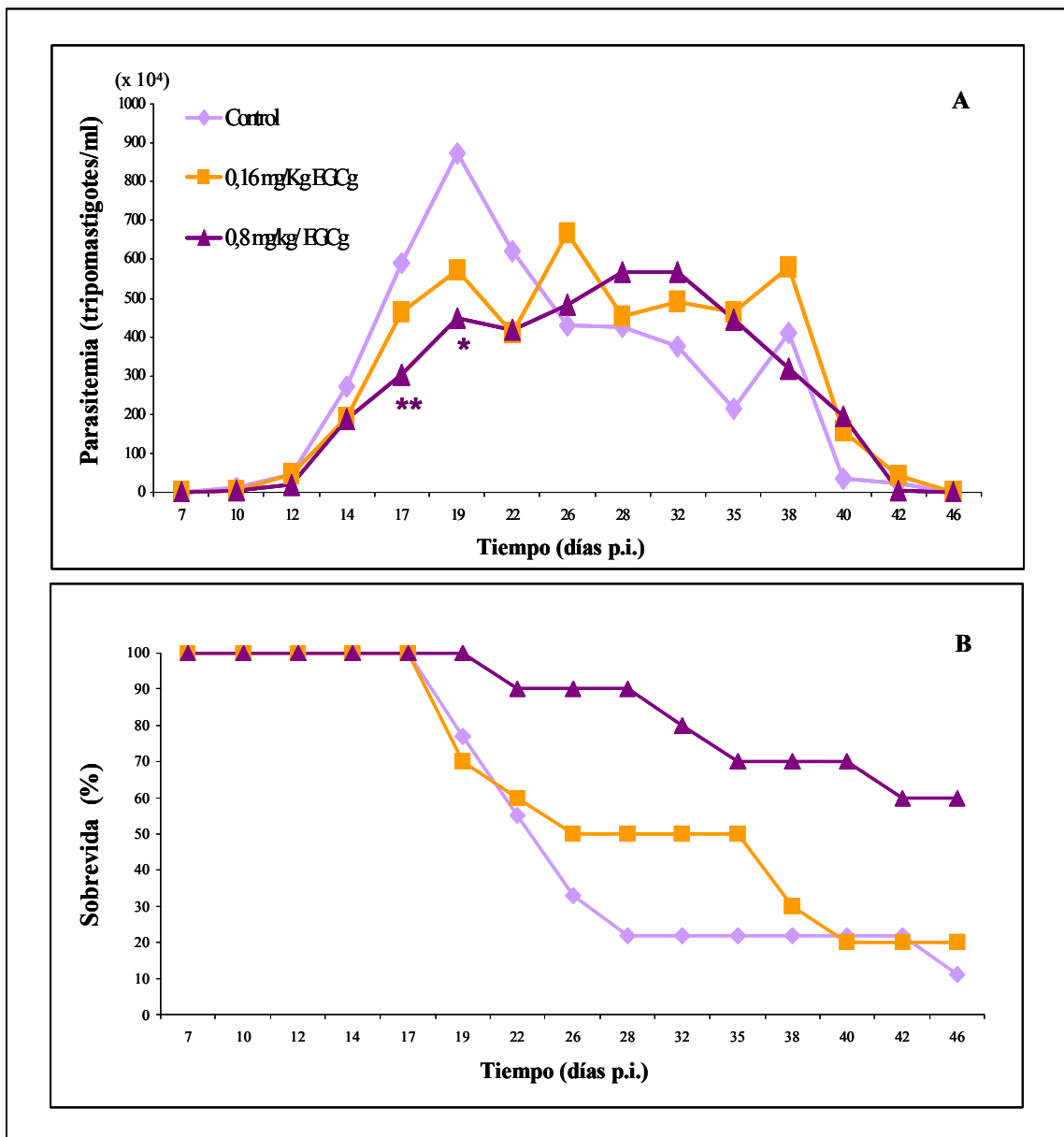
Se evaluó el efecto de la EGCg en un modelo animal según se describe en Materiales y Métodos.

### *2.B.2.1- Administración vía intraperitoneal.*

La figura 9A muestra la evolución de parasitemia, correspondiente a los grupos de ratones que recibieron las distintas concentraciones de EGCg y el grupo control. Tanto éste, como los grupos tratados con la droga, alcanzaron un pico de parasitemia al día 19 p.i., no encontrándose parásitos en sangre al día 40 p.i.

El grupo que recibió la mayor concentración de EGCg (0.8 mg/kg/día), redujo significativamente el número de parásitos en sangre con valores de 47.5 % el día 17 y 49 % 19 p.i. ( **Figura 10A**).

La sobrevivida del grupo de ratones que recibió 0,8 mg/kg/día de EGCg fue del 60%, siendo este mismo grupo el único que presentó una parasitemia menor en el pico de infección. El grupo que recibió 0.16 mg/kg/día de EGCg y el grupo control presentaron valores de sobrevivida del 20% y 11% respectivamente (**Figura 10B**).



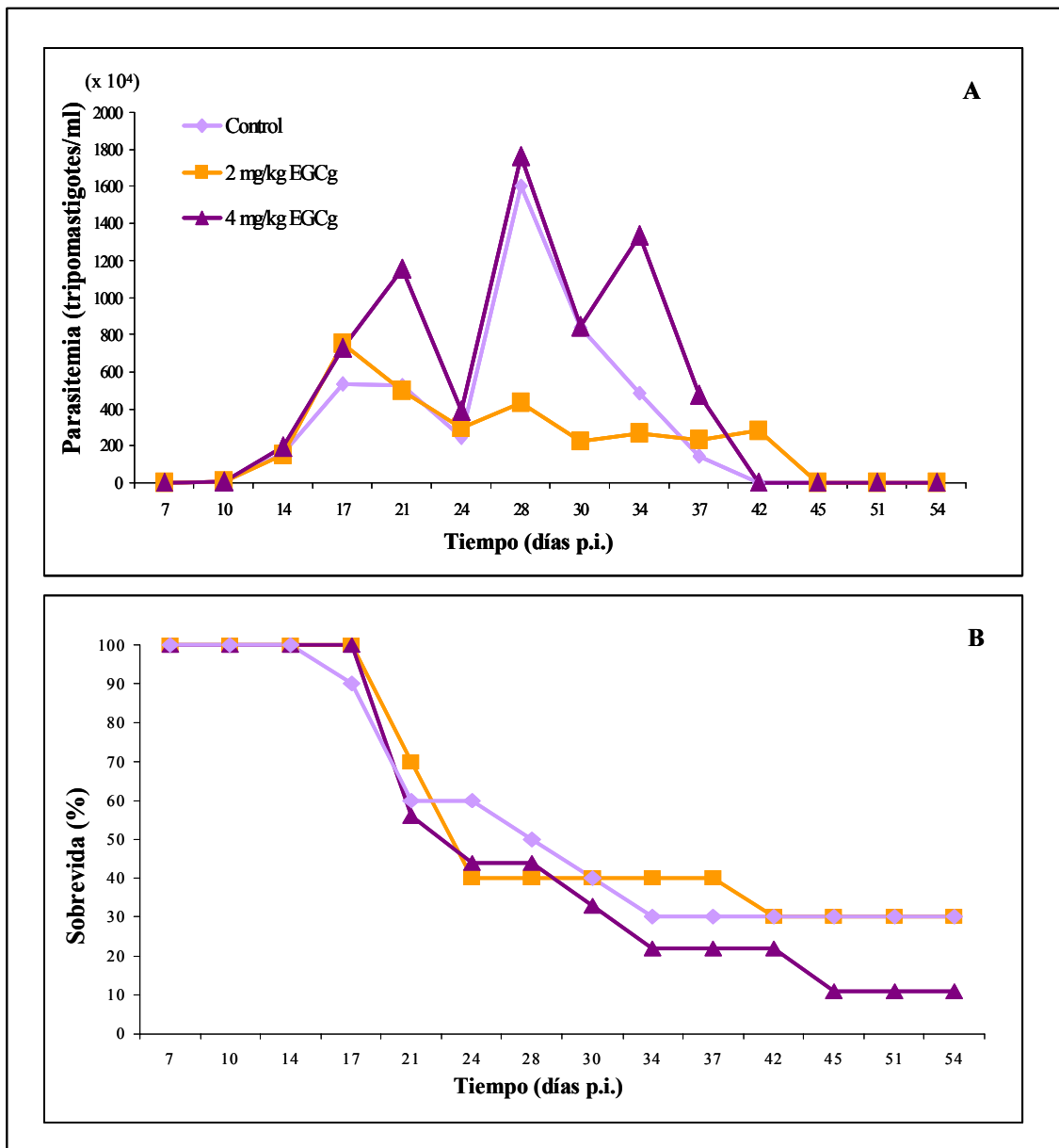
**Figura 10:** Efecto de la EGCg sobre la parasitemia (A) y sobrevivida (B) de ratones infectados con *T. cruzi* y tratados durante 45 días. Los ratones fueron infectados intraperitonealmente con 500 tripomastigotes del stock Tul 2 de *T. cruzi* y 30 minutos después fue iniciado el tratamiento con el siguiente régimen de administración i.p.: 0.16 mg/kg/día de EGCg, 0,8 mg/kg/día de EGCg, control (recibiendo diluyente). (\* p < 0.05; \*\* p < 0.005 )

## **Resultados**

De acuerdo a los resultados positivos de EGCg sobre la parasitemia y sobrevida de los ratones infectados con *T. cruzi*, decidimos realizar un segundo experimento, utilizando la misma metodología, pero aumentando la cantidad de EGCg 2.5 y 5 veces con respecto a la mayor concentración de droga administrada en el experimento anterior (0.8 mg/kg/día) (**Figura 11**).

El comportamiento de la parasitemia fue similar en los grupos de ratones tratados y el control, alcanzando un pico de parásitos en sangre entre los días 17-19 p.i. y no encontrándose parásitos en sangre a partir del día 42 p.i.

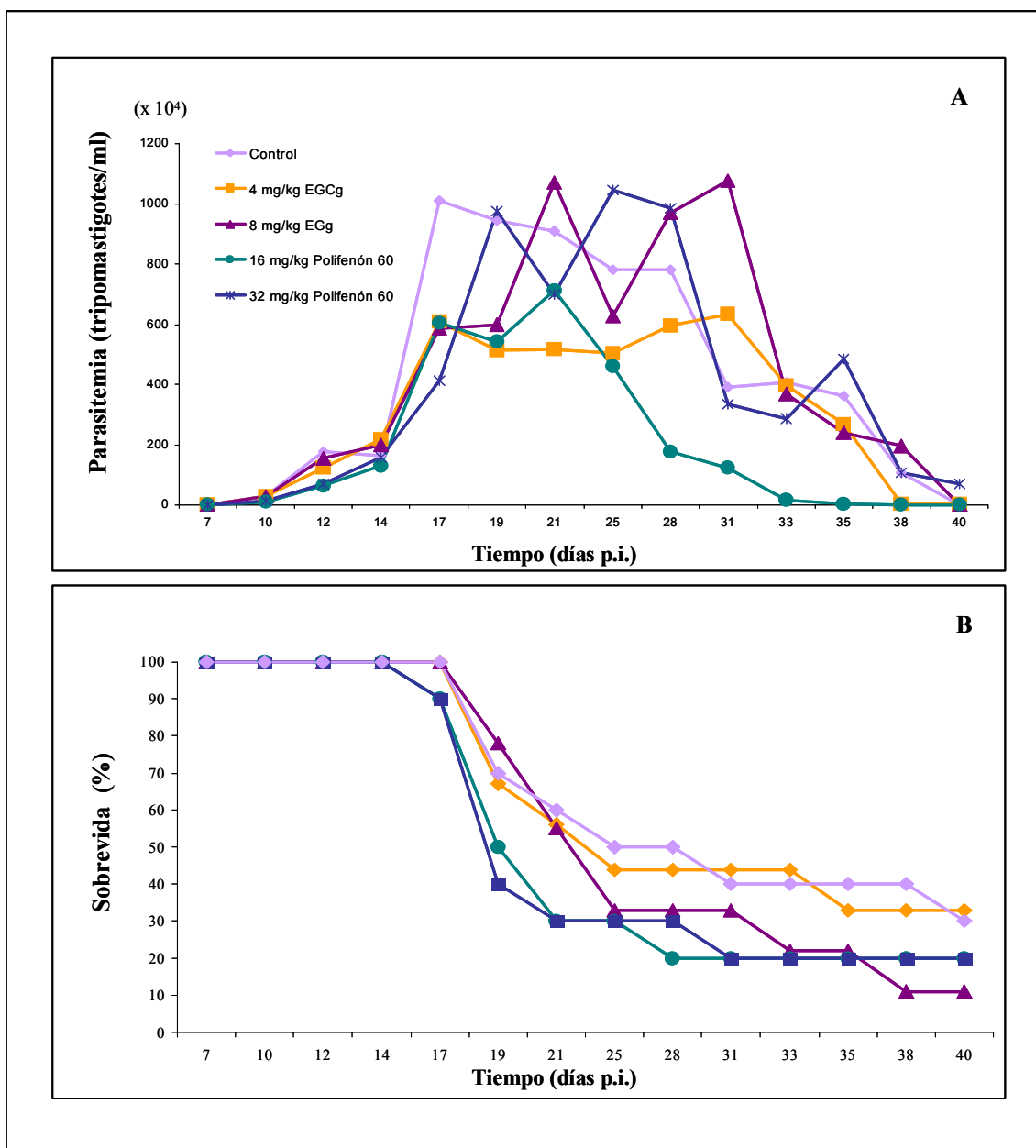
Tanto el curso de la parasitemia como los valores de la misma en los grupos de ratones tratados fueron semejantes a los del grupo control, no habiendo tampoco diferencias en la sobrevida de los animales.



**Figura 11:** Efecto de la EGCg sobre la parasitemia (A) y sobrevida (B) de ratones infectados con *T. cruzi* y tratados durante 45 días. Los ratones fueron infectados intraperitonealmente con 500 tripomastigotes del stock Tul 2 de *T. cruzi* y 30 minutos después fue iniciado el tratamiento con el siguiente régimen de administración i.p.: 2 mg/kg/día de EGCg, 4 mg/kg/día de EGCg, control (recibiendo diluyente).

## 2.B.2.2- Forma de administración oral

Se administraron EGCg y Polifenón 60 (mezcla de catequinas), a través de dos dosis diarias por vía oral en las concentraciones indicadas (**Figura 12**). El pico de parasitemia en el grupo control se produjo al día 17 p.i. y no se detectaron parásitos en sangre al día 40 p.i. Las diferencias entre los grupos tratados y el control no fueron significativas.



**Figura 12:** Efecto de la EGCg y Polifenón 60 sobre la parasitemia (A) y supervivencia (B) de ratones infectados con *T. cruzi* y tratados durante 45 días. Los ratones fueron infectados intraperitonealmente con 500 tripomastigotes del stock Tul 2 de *T. cruzi* y 30 minutos después de iniciado el tratamiento con el siguiente régimen de administración. v.o.: 4 mg/kg/dosis de EGCg, 8 mg/kg/dosis de EGCg, Polifenon 16 mg/kg/dosis, Polifenón 32 mg/kg/dosis, control (recibiendo diluyente).

**2.B.3- Evaluación de la toxicidad en los ensayos de actividad tripanocida de la EGCg y Polifenón 60 en modelo murino**

En cada uno de los experimentos de actividad de la EGCg y Polifenón 60 *in vivo* se realizaron los correspondientes controles de toxicidad. El 100% de los animales de los distintos grupos sobrevivieron al tratamiento.

En el primer experimento de administración i.p. los ratones sacrificados el día posterior a finalizado el mismo, no mostraron daño celular irreversible en los órganos analizados: hígado, riñón, corazón y pulmón. Los mismos resultados se obtuvieron con los animales sacrificados un mes después.

### 3- MECANISMO DE ACCIÓN

La EGCg fue elegida como el compuesto modelo para estudiar el posible mecanismo de acción de las catequinas sobre epimastigotes de cultivo en los ensayos siguientes.

#### 3.1- Actividad quinasa de arginina

La elección de la arginina quinasa (AK) de *T. cruzi* como enzima blanco para comenzar los estudios de mecanismo de acción de las catequinas se basó en la importancia de su participación en el metabolismo energético y su ausencia en el hospedador mamífero. Como antecedentes existían ensayos de inhibición de la actividad de la enzima por el extracto acuoso y fracción polifenólica de té verde de *C. sinensis* (ver introducción).

Los resultados del efecto del EGCg y otras catequinas comerciales se resumen en la **tabla 5**; en la cual se observa que la Cg y la GCg inhiben aproximadamente la actividad de la AK con respecto al control (SA) en las condiciones ensayadas.

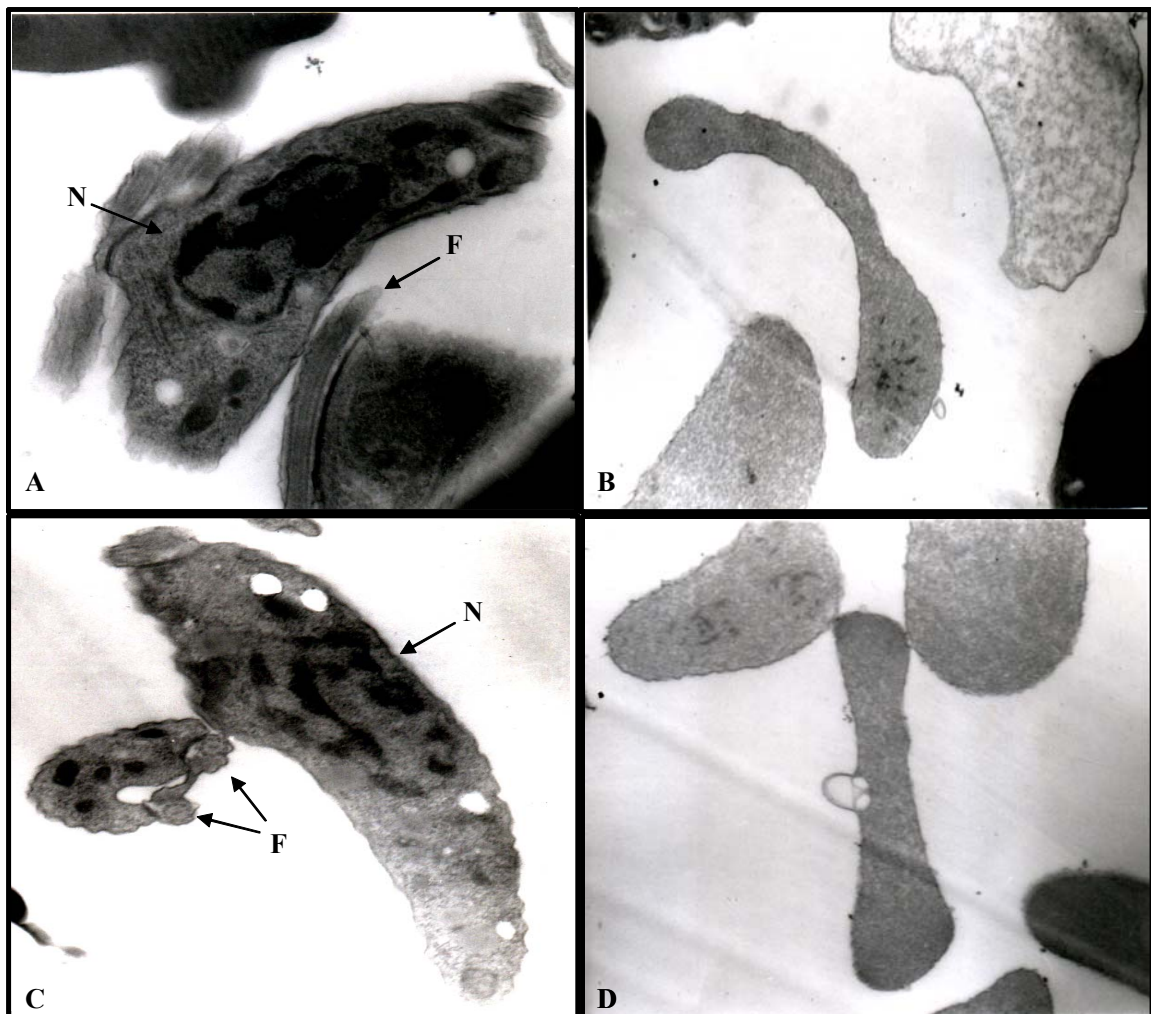
Catequina	Actividad específica (U/mg de proteína) *
SA	8.4 ± 1.1
C	7.8 ± 0.1
EC	6.9 ± 1.3
Cg	4.4 ± 0.6 *
GC	6.1 ± 0.8
EGC	5.4 ± 0.7
GCg	4.5 ± 0.3 *
EGCg	7.6 ± 0.2

**Tabla 5:** Efecto de las catequinas comerciales sobre la actividad de la AK.\* La unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que produce 1 $\mu$ M de fosfoarginina por minuto de incubación La concentración de catequinas en el medio de incubación fue de 1nM. (\* p<0.05) SA : Sin Agregado de catequina



### 3.2- Microscopía electrónica de tripomastigotes sanguíneos

Los tripomastigotes sanguíneos tratados con EGCg mostraron alteraciones ultraestructurales observadas al microscopio electrónico, consistentes en una desorganización subcelular generalizada, sin ruptura de la membrana plasmática (**Figura 13**). En los tripomastigotes no tratados se observaron las características estructurales típicas de los tripanosomátidos.

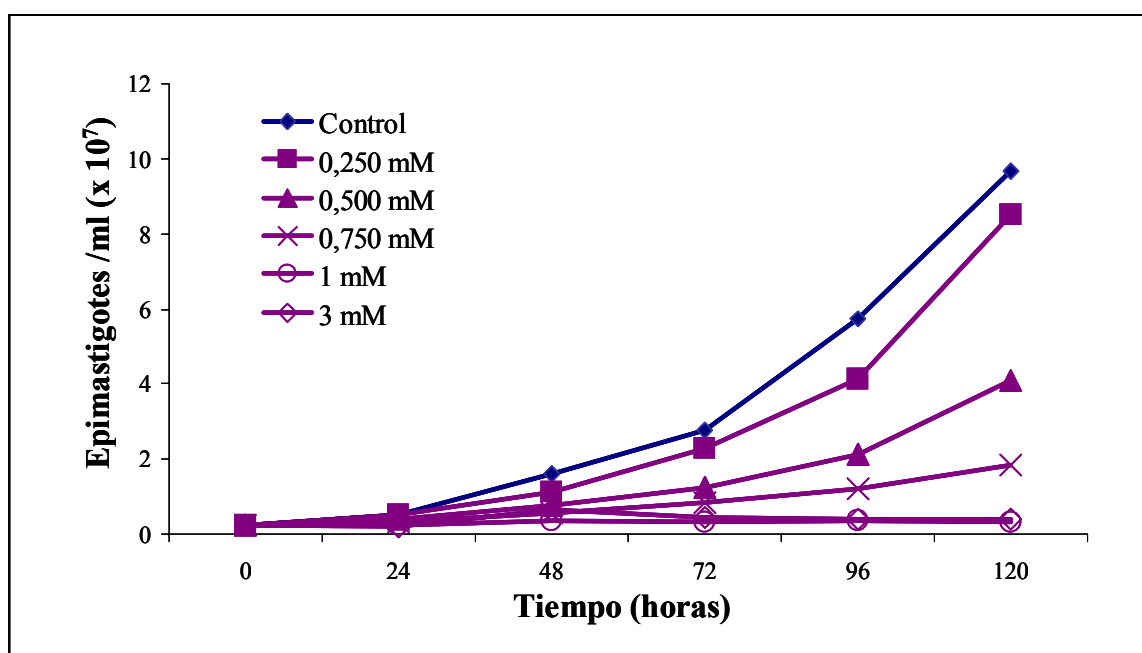


**Figura 13:** Efecto de la EGCg sobre la ultraestructura de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*. Stock tul 2 a 15 y 60 minutos de incubación. **A y C** parásitos control (tratados con diluyente) a los 15 y 30 minutos de incubación respectivamente. **B y D** Parásitos tratados con 1 nM de EGCg durante 15 min y 60 minutos respectivamente. (N) Núcleo; (F) Flagelo. 24.000x

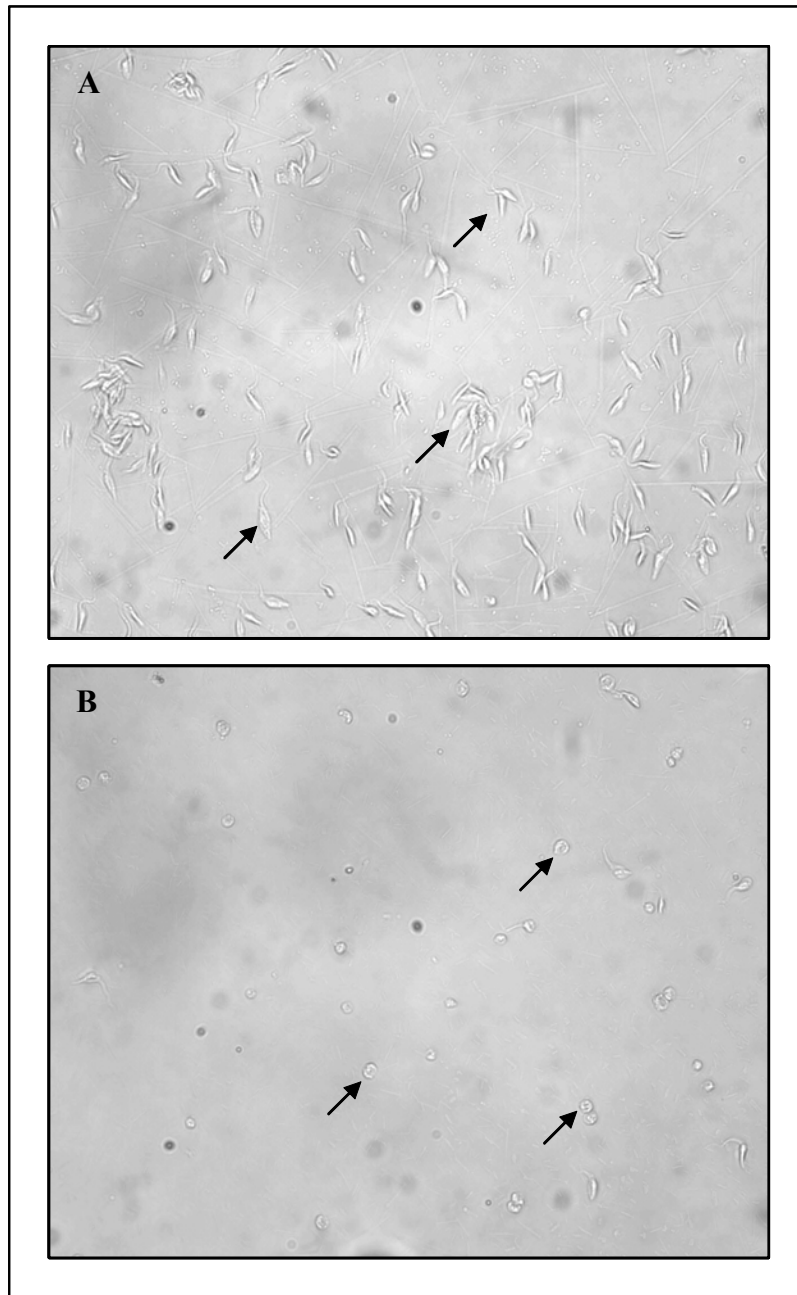
### 3.3- Análisis de la actividad tripanocida sobre epimastigotes

Se determinó el efecto de la EGCg sobre el crecimiento de epimastigotes en medio de cultivo líquido. Se observó una inhibición sobre la proliferación celular dependiente de la dosis en un rango de concentraciones entre 250  $\mu\text{M}$  y 1 mM y se obtuvo una  $\text{IC}_{50}$  de 311  $\mu\text{M}$  (Figura 14).

A concentraciones de 1 mM la inhibición del crecimiento fue total, con cambios en la morfología celular: los epimastigotes pierden su forma alargada, transformándose en células redondeadas. No obstante el ensayo realizado con el colorante azul de tripán, no revela alteraciones en la viabilidad (Figura 15).



**Figura 14:** Efecto de la EGCg sobre el crecimiento de epimastigotes de cultivo del stock Tul 2. Se obtuvo un  $\text{IC}_{50}$ : 311  $\mu\text{M}$ . Se agregó Bz como control positivo (12 $\mu\text{M}$ ) en cada una de las determinaciones ensayadas por triplicado.



**Figura 15:** **A.** Epimastigotes de cultivo en fase exponencial (Control). Las flechas indican los parásitos con la forma alargada y la presencia de flagelo. **B.** Epimastigotes tratados con 1 mM de EGCg. Las flechas indican la forma redondeada y pérdida de flagelo que adoptan los epimastigotes luego de la incubación con EGCg.

### **3.4- Muerte celular programada**

El comportamiento de epimastigotes observado con las diferentes concentraciones de EGCg, mostró una inhibición total de la proliferación celular con alteración morfológica a las concentraciones más altas utilizadas. El tratamiento de parásitos con azul de tripán permitió ver que la viabilidad celular no estaba disminuida. Por eso estudiamos si se trataba de un proceso de muerte celular programada (PCD) para explicar la inhibición del crecimiento de epimastigotes.

#### *3.4.1 Observación de fluorescencia de extremos OH 3' de ADN fragmentado.*

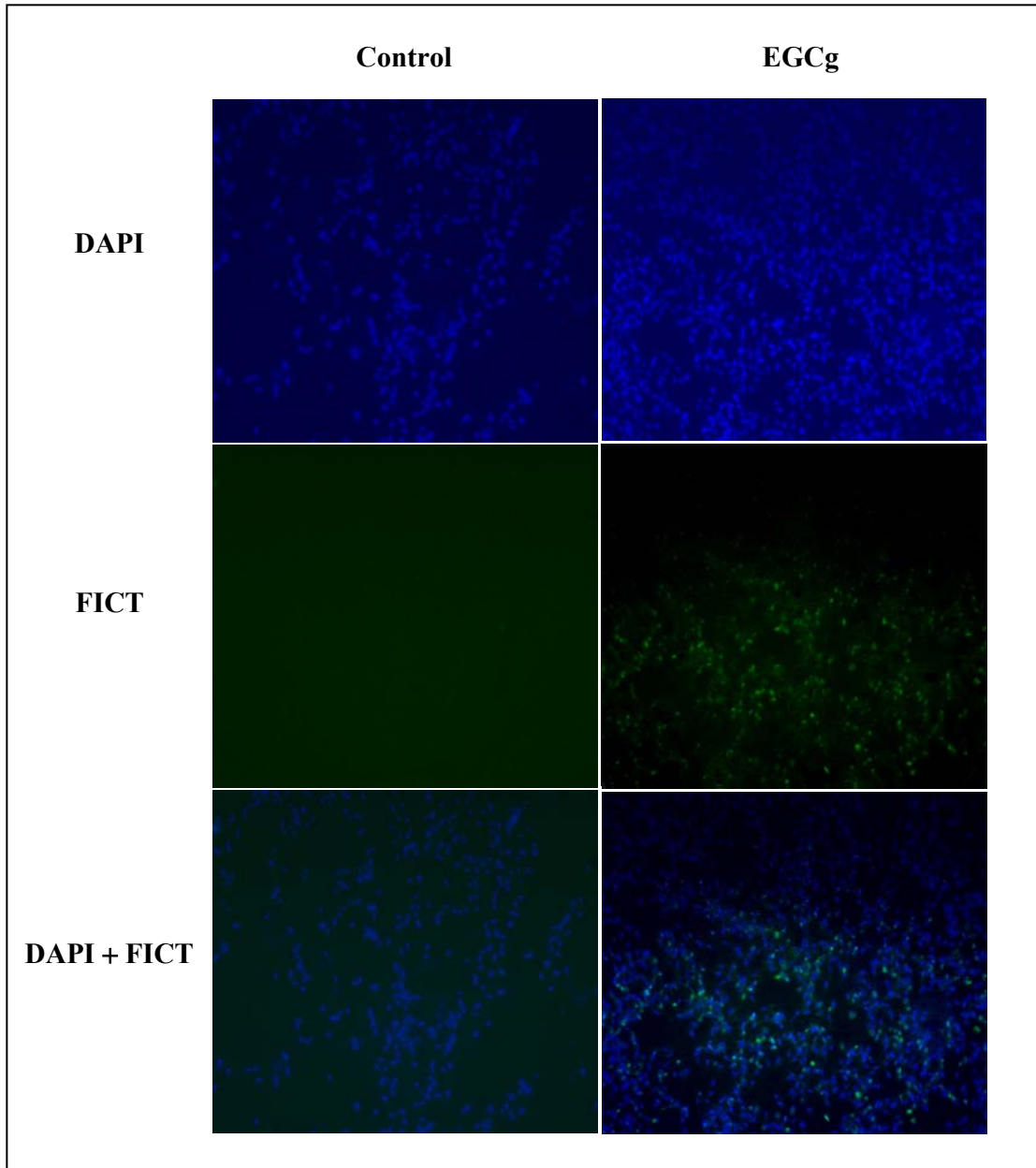
Debido a que la fragmentación del ADN es una de las características de células en este proceso de muerte, se analizó la fragmentación del ADN mediante un sistema de detección fluorométrico de los extremos OH 3' libres. La incubación de epimastigotes con concentraciones de 1 mM de EGCg durante 24 horas, produjo fragmentación del ADN (**Figura 16**).

#### *3.4.2- Análisis de la fragmentación oligosomal del ADN*

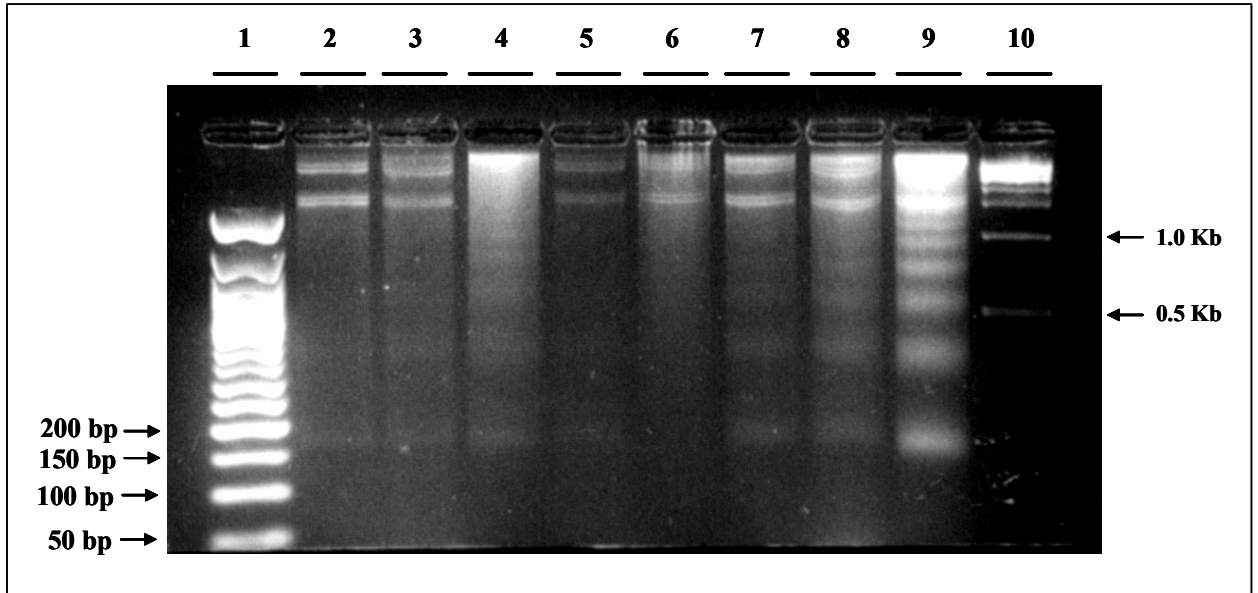
La fragmentación oligosomal del ADN en los parásitos tratados se confirmó mediante la visualización de los fragmentos resueltos por electroforesis en gel de agarosa (**Figura 17**).

Los ensayos se realizaron con cultivos de epimastigotes no mayores a 3 días, ya que el perfil electroforético de los cultivos envejecidos es similar al apoptótico (Debrabant A y col., 2003; Ouaisi A 2003) (calle 9 de la **figura 17**). Se utilizó como controles la inducción de PCD con suero humano fresco y un cultivo en fase estacionaria.

En las calles 8 y 9 del gel se observa un patrón de corrida de los fragmentos de ADN similares con los correspondientes al control con suero humano fresco y al cultivo viejo, confirmando la fragmentación del ADN de los parásitos tratados con 1 mM de EGCg que se observó en el experimento anterior y demostrando que la fragmentación es oligosomal.



**Figura 16:** Observación de la fragmentación del ADN de epimastigotes de cultivos tratados con EGCg. En los paneles de la izquierda se observan las imágenes resueltas en el microscopio de fluorescencia de los parásitos sin tratar, y en los de la derecha los parásitos incubados con EGCg. En las fotos superiores se ven los núcleos de todos los parásitos teñidos con DAPI, en las centrales la fluorescencia del FICT en los parásitos que tienen fragmentado su ADN y en las inferiores la superposición de filtros que muestra colocación de las fluorescencias en los parásitos. Los datos se compararon con los respectivos controles positivos y negativos de la tinción con FICT según las prescripciones del kit.



**Figura 17:** Efecto de la EGCg sobre la fragmentación del ADN.  $3 \times 10^8$  epimastigotes fueron incubados a  $28^\circ\text{C}$  durante 24 horas en medio LIT, (**calle 2**, control), con suero humano fresco 10% (**calle 4**, control positivo), suero humano fresco 10% inactivado (**calle 5**, control del suero),  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM (**calle 6**, control de necrosis), ó 1 mM de EGCg (**calle 7**). La **calle 9** corresponde a un cultivo de epimastigotes de 15 días. En la **calle 3** se sembraron  $6 \times 10^8$  epimastigotes sin tratar y en la **calle 8** a  $6 \times 10^8$  tratados con EGCg. Luego del período de exposición, el ADN fue extraído y concentrado según se describe en Materiales y Métodos, y visualizado en un gel de agarosa 2 %. En las **calles 1** y **10** se sembraron los marcadores de peso molecular de 50 bp y 1 kb respectivamente.

# *Conclusiones*

## ***Conclusiones***

Los resultados más sobresalientes obtenidos en esta tesis permiten concluir que:

- Los extractos orgánicos provenientes del té verde de *C. sinensis* poseen actividad tripanocida.
- El extracto orgánico de mayor actividad tripanocida está compuesto principalmente por catequinas.
- Las catequinas comerciales puras poseen actividad tripanocida a concentraciones del orden de pM sobre tripomastigotes sanguíneos.
- Las más activas contra la forma de tripomastigote sanguíneo de *Trypanosoma cruzi* fueron GCg y EGCg.
- Estos compuestos mostraron actividad tripanocida contra las formas replicativas epimastigote y amastigote.
- La administración de 0.8 mg/kg/día de EGCg vía i.p. durante 45 días logró disminuir la parasitemia y aumentar la sobrevida en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, en comparación con el grupo control.
- La EGCg no es tóxica en las condiciones probadas.
- La EGCg induce muerte celular programada (PDC) en epimastigotes de cultivo.



# *Discusión*

Las enfermedades infecciosas re-emergentes y la resistencia de muchos patógenos a las drogas actualmente en uso, son problemas serios ampliamente conocidos y que requieren de inmediata ocupación (Weinger B y col., 2001). Específicamente en la enfermedad de Chagas, fueron descriptas las limitaciones de las únicas drogas en uso, Nifurtimox y Benznidazol, en cuanto a su efectividad, toxicidad y continuidad en el mercado.

Desde hace un siglo los productos naturales han jugado un rol muy importante en la quimioterapia de enfermedades parasitarias con la quinina, emetina y berberina usadas para el tratamiento de malaria, amebiasis y leishmaniasis respectivamente, y santonina usado para infecciones de helmintos (Croft SL, 2001).

Por estas razones, la necesidad de hallar sustancias tripanocidas junto a los estudios de su mecanismo de acción para facilitar el desarrollo racional de compuestos líderes, es una excelente justificación para la actual búsqueda de compuestos naturales activos contra *T. cruzi* y organismos relacionados (Sepúlveda-Boza S y Cassels BK, 1996).

La actividad tripanocida encontrada en el extracto acuoso del té verde de *C. sinensis* sobre la forma tripomastigote de *T. cruzi* generó el interés en la búsqueda de compuestos activos a partir de este extracto, ya que entre las numerosas actividades biológicas descriptas para esta especie, no había antecedentes sobre el posible efecto antiparasitario de sus componentes. Esto provee la posibilidad de descubrir nuevas moléculas de estructura única con actividad y selectividad altas, las cuales pueden ser posteriormente optimizadas por procesos de síntesis, y consecuentemente reducir la toxicidad, los efectos secundarios indeseados y mejorar la biodisponibilidad de la droga (Kayser O y col., 2003).

En la F5 se concentró la mayor parte de la actividad tripanocida (**Tabla 1**) y de acuerdo a la metodología de fraccionamiento seguido, ésta debería ser rica en catequinas ya que los antecedentes bibliográficos describen la preparación de estos polifenoles precisamente mediante una extracción con acetato de etilo. Los datos existentes sobre las actividades biológicas de estos componentes permitieron postular que la actividad tripanocida del mismo podría deberse a la presencia de las catequinas, aún sin descartar otros componentes no identificados.

Para el sub-fraccionamiento de la F5 se utilizó una columna de Sephadex LH-20, adecuada para la separación de los compuestos aromáticos de bajo tamaño molecular y estructura semejante porque utiliza la interacción iónica ó adsorción entre compuestos iónicos, y aromáticos o heterociclos respectivamente con los grupos  $-\text{COOH}$  y  $-\text{OH}$  de la resina.

Sin embargo, todas las fracciones resultantes de la columna de Shephadex mostraron una actividad tripanocida semejante en las condiciones ensayadas y alcanzaron al menos el 50% de lisis de tripomastigotes con 0,2 mg/ml, una concentración menor a la cual la F5 mostró la misma actividad (**Figura 2**).

Por esta razón analizamos la composición de las 62 fracciones provenientes de la columna por TLC, la cual mostró que gran parte de las fracciones contenían compuestos similares a las catequinas utilizadas como estándares (**Figura 3**).

Con la hipótesis que las catequinas podían ser alguno de los compuestos con la actividad biológica estudiada, se pensó que podrían estar presentes en las fracciones provenientes del Sephadex en concentraciones no detectables en la TLC y que esa concentración residual era responsable de la actividad biológica.

Dado que las fracciones que parecían estar más enriquecidas en cantidad y variedad de catequinas eran las fracciones 16 a 40 se decidió unir las en lo que se denominó F 16-40. La presencia de las catequinas fue confirmada por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El hecho de que el cromatógrafo tuviera adosado un detector de diodos, permitió no sólo detectar estos componentes en la nueva fracción sino también caracterizar qué serie de catequinas estaban presentes en la muestra. De los resultados del HPLC se pudo caracterizar las siete catequinas mayoritariamente reportadas en el té verde (**Figura 4**).

Confirmada su presencia y al ser éstas compuestos comerciales que se venden purificados a partir de *C. sinensis* se decidió ensayarlas antes de proseguir con la purificación de las fracciones.

Las concentraciones a las cuales se logra el máximo efecto lítico ( $\sim 90\%$ ) son entre 10 y 100 nM según el compuesto, y los valores de  $\text{IC}_{50}$  señalan finalmente la EGCg y GCg como los dos compuestos más activos, aunque cualquiera de las catequinas restantes poseen una muy buena actividad

tripanocida, debido a las bajas concentraciones con las que logran sus correspondientes IC<sub>50</sub> (**Figuras 5, 6 y tabla 3**).

Los resultados de lisis de tripomastigotes obtenidos con las catequinas comerciales puras, nos permitieron describir su efecto tripanocida, señalarlas como al menos algunos de los compuestos responsables de la actividad observada en el extracto acuoso del té verde de *C. sinensis*, y finalmente demostrar que presentan una IC<sub>50</sub> extremadamente baja.

La concentración en la que estos compuestos son activos, podría entonces ser la causa de la actividad tripanocida observada en las 62 fracciones provenientes de la cromatografía en columna, ya que la cantidad remanente en las primeras y últimas fracciones de la TLC podría ser suficiente como para contener la actividad biológica observada.

El sistema biológico que se utiliza en los primeros ensayos para estudios y búsqueda de drogas contra *T. cruzi* es la forma de epimastigotes de cultivo. De todos modos es fundamental el ensayo de compuestos tripanocidas *in vitro* sobre tripomastigotes sanguíneos a 4 °C, para evaluar el efecto en la profilaxis de sangre y a 37 °C para el tratamiento. Los ensayos de profilaxis fueron realizados con todas las fracciones y catequinas puras durante los procedimientos de purificación bioguiada, resultando la EGCg y GCg, las dos moléculas más activas sobre el estadio tripomastigote, indicando también que el medio sanguíneo no es inactivante de la actividad tripanocida de estos compuestos. De esta forma se seleccionaron estas catequinas para estudios de actividad *in vitro* sobre el estadio intracelular de amastigote del parásito. Es éste, el otro ensayo *in vitro* de importancia en la búsqueda de drogas para la enfermedad de Chagas, ya que permite evaluar tanto la sensibilidad a estos compuestos en el estadio que origina la fase crónica de la enfermedad como la variación de la infectividad de los tripomastigotes a 37°C (Sepúlveda-Boza S y Cassels BK, 1996; Coura JR y Castro SA, 2002). Los resultados obtenidos en este experimento indican claramente que tanto la EGCg como la GCg, inhiben la infección de células en cultivo por tripomastigotes a 37°C, y la replicación de la forma intracelular del parásito (**Tabla 4**), lo que hace posible proponer a estos compuestos para ensayos *in vivo* con vistas a una posible quimioterapia para la enfermedad de Chagas.

Las diferentes estructuras moleculares y metabolismo entre los estadios tripomastigote y amastigote de *T. cruzi* descritos, podrían ser unas de las razones por las cuales existe tanta diferencia en las concentraciones de catequinas a las cuales estos estadios son susceptibles. Otra de las razones recae en el sistema de estudio *in vitro*, ya que los diferentes medios, temperaturas y tiempo de ensayo pueden afectar la estabilidad de la droga (Chen Z y col., 2001; Wang R y Zhou W, 2004). De acuerdo a la estabilidad de estos compuestos, se describió que la EGCg disuelta en un medio de cultivo celular, como el usado en los experimentos *in vitro* sobre amastigotes, es degradada rápidamente durante los primeros 60 minutos, demostrando la baja estabilidad de la molécula (Lam WH, 2004).

La infección de *T. cruzi* al huésped mamífero, se produce en diferentes tipos celulares, siendo los macrófagos uno de ellos. Se decidió caracterizar la actividad tripanocida del mismo en cultivo primario de macrófagos murinos intraperitoneales con el objeto de estudiar la participación que tienen estas células fagocíticas en el sistema inmune. Ésto nos permitiría evaluar no solo el comportamiento de la droga en un tipo celular más cercano a lo que ocurre *in vivo*, si no también el efecto que puede causar en los macrófagos. El parámetro de evaluación fue la producción de óxido nítrico, debido a que es una molécula citotóxica producida por macrófagos activados. Existen antecedentes bibliográficos que describen efectos diversos de las catequinas sobre la producción de esta molécula en distintos sistemas celulares.

Los resultados de este experimento (**Figura 8**) muestran que la concentración de EGCg que disminuye aproximadamente el 50% de las células infectadas es de 4  $\mu\text{M}$ ; y concentraciones que rodean a este valor aumentan moderadamente la producción de óxido nítrico de los macrófagos. Esta molécula es esencial para la actividad tripanocida, pero la exposición crónica a este mediador puede estar asociado a síntomas clínicos durante las infecciones por tripanosomas (Madani-Matsuda M y col., 2004). Los valores de concentración de NO producidos por los macrófagos tratados con EGCg, podrían favorecer la actividad tripanocida de la droga, y no serían tan elevados como para provocar una respuesta inmune nociva en el huésped. Una posible explicación de los bajos niveles de producción o la subestimación de los niveles de NO es que los

polifenoles, como describen ciertas publicaciones, pueden ser oxidantes o antioxidantes según el medio, y podrían en este modelo estar atrapando los radicales de NO extracelular, siendo menor la concentración de nitritos que pueda ser captada por el reactivo de Griess (Kolodziej H y col., 2001). En este sentido, nuestros resultados concuerdan con aquellos datos bibliográficos que describen el aumento de la producción de óxido nítrico en macrófagos por catequinas, en contraste con aquéllos que describen la disminución de éste producidas por las mismas, comprobando una vez más la versatilidad de comportamiento de estos compuestos según el sistema en estudio (Chan MM y col., 1997).

Para realizar los estudios de la actividad tripanocida de la EGCg *in vivo*, se tuvieron en cuenta tanto los datos bibliográficos y experimentales de toxicidad, como los datos de biodisponibilidad y estabilidad de la EGCg.

En cuanto a la toxicidad, no hay datos sobre los efectos adversos que puede causar el consumo diario de las catequinas ingeridas en infusiones de té verde. Dado que una taza de este té contiene alrededor de 150 mg de EGCg, no sería ésta una concentración tóxica en humanos (Abe I y col., 2000). No se encontró toxicidad aguda y crónica en los polifenoles del té a 350 mg/kg/día en ratas durante 10 días; lo cual sugiere que esa dosis no es tóxica en ratas (Abe I y col., 2000), lo que podría explicarse por la baja concentración en sangre de las catequinas luego de la administración oral de las mismas.

La concentración plasmática de EGCg libre luego de la administración oral varía entre el 0,01-0,3 % según el sistema en estudio (rata, ratón, humanos), y el tiempo de vida media es de aproximadamente de 2 hs (Zhu M y col., 2000; Meng X y col., 2002; Lambert JD y col., 2003). No hay estudios de la concentración que permanece en plasma cuando la vía de administración es i.p., excepto un estudio realizado en ratas que describe que para lograr por vía i.p., la misma concentración de EGCg en plasma que se consigue por la administración oral, utilizan una concentración 100 veces menor de catequina (Zhu M y col., 2000).

Con estos antecedentes, en el primer experimento de actividad tripanocida *in vivo*, se eligió la vía intraperitoneal para administrar durante 45 días una dosis diaria de la droga (**Figura 10**). Considerando la baja estabilidad de la EGCg

en un medio acuoso a pH neutro, cada dosis se preparó en el momento de la administración.

El primer experimento para evaluar la toxicidad de la EGCg en nuestro modelo (**Figura 9**), indicó que la administración intraperitoneal de 16.3 mg/kg/día (casi 500 µg) de esta catequina durante tres días producía efectos tóxicos inmediatos irreversibles (necrosis hepatocelular). Sin embargo, los animales que fueron estudiados un mes después de suspendida la administración de EGCg, presentaron un aspecto histológico normal. Si bien este experimento se realizó sólo durante tres días, los resultados indicaban que ésta sería una concentración de droga que podría llegar a tener severos efectos tóxicos en el caso de administrarla durante el total de días del experimento, siendo ésta la cantidad límite para su uso.

De todas maneras en cada ensayo de actividad tripanocida *in vivo* se incluyeron los controles de toxicidad de la catequina correspondientes al modelo experimental, a pesar de que la cantidad de EGCg administrada en cada ensayo fue menor que en el experimento de toxicidad mencionado. Las dosis se determinaron de acuerdo a los valores de actividad tripanocida resultantes de los experimentos *in vitro* y los datos de biodisponibilidad.

La actividad tripanocida de los experimentos *in vitro* se correlacionan con los resultados de disminución de parasitemia y consecuente aumento de sobrevivencia de los ratones infectados con *T. cruzi* tratados con la mayor cantidad de EGCg en el primer experimento *in vivo* realizado (**Figura 10**).

El aumento de 5 veces en la concentración de la droga, no disminuyó la parasitemia en ninguna de las condiciones ensayadas, lo que puede atribuirse a las características de farmacodinamia y farmacocinética de la EGCg (**Figura 11**).

En el tercer experimento se cambió la administración de la EGCg a la vía oral. A pesar que la cantidad de droga a utilizar es mayor, esta forma de administración genera una ventaja muy importante en las perspectivas de un tratamiento y permitiría la administración de dos dosis diarias, conveniente para conservar lo más posible la droga en plasma. Se incluyó en el experimento el Polifenón 60 ya que es una mezcla de catequinas equivalente a la F5 y más económico que la EGCg pura. Ésto facilitó el uso de altas concentraciones de droga a fin de tener la posibilidad de estudiar el efecto del

conjunto de catequinas y comparar posteriormente una catequina pura a la misma concentración. A pesar de ello, no se obtuvieron efectos positivos sobre la disminución de la parasitemia ni en el aumento de la sobrevivencia de los ratones con ninguna de las concentraciones usadas, ni tampoco con el Polifenón 60, (**Figura 12**). Este resultado podría deberse a que, a pesar de administrar dosis diarias, la cantidad de droga en plasma habría estado por debajo de la concentración efectiva (Ver anexo).

La disminución de la parasitemia *in vivo* sumado a los resultados de los experimentos *in vitro*, nos permiten proponer a la EGCg como molécula a estudiar no sólo como posible agente tripanocida en bancos de sangre, sino también como posible droga contra la enfermedad de Chagas.

Los estudios de mecanismo de acción, posibilitan describir el modo en que actúa un compuesto *in vitro* y extrapolarlo al posible mecanismo *in vivo*. En base a estos datos se puede mejorar su actividad biológica y disminuir la posible toxicidad que puede generar la droga.

Encontramos que Cg y GCg, pero no EGCg, inhibieron aproximadamente el 50% la actividad de la quinasa de arginina a concentraciones cercanas a 1nM (**Tabla 5**). El hecho de que de todas las catequinas ensayadas sólo la Cg y GCg inhibieron fuertemente la actividad de la AK, indican que diferencias estructurales entre estos compuestos podrían otorgar la capacidad de unirse específicamente a sitios de la enzima.

Por otro lado se realizaron ensayos de actividad de quinasas de proteínas de *T. cruzi* en presencia de catequinas en los que a concentraciones nanomolar no se observó inhibición. Pero sí existen antecedentes de efectos inhibitorios sobre actividades enzimáticas en células de mamífero a concentraciones del orden de micromolar y menores. Ejemplo de ello son: la NADH oxidasa de células epiteliales de mamífero (Morré DJ y col., 2000), sintasa de óxido nítrico de macrófagos murinos (Chan MM y col 1997), la 5- $\alpha$  reductasa humana (Liao S y Hiipakka RA 1995), y la uroquinasa (Janhun y col., 1997).

De acuerdo a los resultados obtenidos *in vitro* y a los ensayos enzimáticos, no podemos concluir que la lisis de los parásitos es consecuencia de la inhibición de la AK, la cual tampoco ha sido validada como blanco hasta el momento. Es



muy difícil atribuir la actividad inhibitoria de enzimas al efecto tanante descrito para las catequinas debido, tanto a la baja concentración efectiva determinada en nuestro sistema, como al comportamiento diferencial de las catequinas ensayadas.

Los protozoarios flagelados poseen organelas y estructuras especiales, ya descritas en esta tesis cuya alteración específica por alguna droga podría sugerir un probable mecanismo de acción. Por ejemplo, uno de los efectos característicos de los inhibidores de la síntesis del ergosterol en tripanosomátidos es una deformación marcada del mitocondrion, que se correlaciona con la falta de ergosterol endógeno y produce la lisis celular (Garzoni LR y col 2004). Para determinar si la EGCg podría estar causando algún efecto que provoque el daño de una organela en particular, se analizó por microscopía electrónica tripomastigotes tratados con 1nM EGCg. La concentración elegida es mucho mayor a la que corresponde a la IC<sub>50</sub> para el efecto lítico *in vitro*, y sin embargo sólo se vió una desorganización general de las células tratadas (**Figura 13**).

La existencia de un mecanismo de muerte celular programada para explicar el efecto de la EGCg está sugerida por datos previos y por resultados obtenidos en este trabajo.

En cuanto a los datos previos, se publicó que los flavonoides inducen apoptosis en *Leishmania* (Kolodziej H y col., 2001), que la EGCg específicamente induce apoptosis en células de mamífero, y daño en el ADN *in vitro*, a pesar de los datos contradictorios que se puedan encontrar (Furukawa A y col., 2003).

La concentración de 1 mM de EGCg inhibe totalmente la proliferación de epimastigotes de cultivo con cambios morfológicos (**Figuras 14 y 15**) y aparente integridad de membrana. Estos resultados sugerían un metabolismo consecuente a una inducción de mecanismo de muerte celular programada. Con la caracterización de la curva de crecimiento de epimastigotes fijamos las condiciones de los experimentos de apoptosis. Los dos abordajes utilizados muestran la fragmentación y la característica de esta fragmentación en el ADN de los parásitos tratados con EGCg, lo que nos permite sugerir que esta catequina sería un inductor de la muerte celular programada en epimastigotes de *T. cruzi* (**Figuras 16 y 17**).

Uno de los recientes factores de inducción de muerte celular programada descritos en *T. cruzi*, es el estrés oxidativo (Debarbant A y col, 2003; Ouaiissi A, 2003). Habiendo ya mencionado las controversias bibliográficas de la actividad antioxidante y prooxidante de la EGCg en diversos sistemas, se estudió si la causa de la actividad tipo apoptosis en epimastigotes de *T. cruzi*, era consecuencia del estrés oxidativo que podría estar generado por la EGCg en nuestro sistema.

Se decidió medir el nivel de tioles totales (tioles de alto y bajo peso molecular) en parásitos tratados con 1 mM de EGCg a tiempos cortos (10 min), con el objeto de evaluar si la EGCg generaba un estrés oxidativo tal que bajara el nivel de tioles con respecto a un cultivo control. No encontramos diferencias entre los parásitos tratados y los controles que no recibieron droga. Estos resultados no permiten descartar la existencia de un estrés oxidativo generado por la EGCg. Este es uno de los objetivos de los futuros experimentos y con el que se está trabajando, dentro de la continuidad en el estudio de mecanismo de acción.

En cuanto a este compuesto como posible droga para una quimioterapia para la enfermedad de Chagas, son muchos los temas a desarrollar, siendo ejemplo de los más importantes los siguientes:

- Ensayar distintas concentraciones, número de dosis y forma de administración de la EGCg en modelos murinos de la enfermedad de Chagas aguda y crónica.
- Ensayar la actividad del compuesto sobre las distintas cepas del *T. cruzi*, siendo de gran relevancia las resistentes a Nfx y Bz.

Las ventajas que presenta la molécula de la EGCg como droga para la enfermedad de Chagas son: ser el principal componente de los polifenoles del té verde y no mostrar toxicidad a dosis efectivas.

Las principales desventajas son su ineficiente absorción y su inestabilidad (Wang X y Tian W, 2001), características que hoy pueden ser modificadas químicamente sin perder la actividad del compuesto (latenciación de drogas), al igual que dirigirlo a los tejidos de interés a fin de disminuir la toxicidad.

# *Bibliografia*

Abe I, Seki T, Umehara K, Miyase T, Noguchi H, Sakakibara J and Ono T. **2000** Green tea polyphenols: novel and potent inhibitors of squalene epoxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 268(3):767-71.

Alonso GD, Pereira CA, Remedi MS; Paveto MC; Cochella L, Ivaldi M.S, Gerez de Burgos NM, Torres HN and Flawia MM **2001**. Arginine kinase of the flagellate protozoa *Trypanosoma cruzi*. Regulation of its expression and catalytic activity. *FEBS Lett.* 498(1):22-5.

Andersson J. **2004**. Molecular diagnosis of experimental Chagas disease.. *Trends Parasitol.* 20 (2): 52-53.

Andrade LO and Andrews NW. **2005**. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol.* 10:819-23.

Arakawa H, Maeda M, Okubo S and Shimamura T. **2004**. Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. *Biol Pharm Bull.* (3):277-81.

Barrett MP, Burchmore RJS, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ and Krishna S. **2003**. The trypanosomiases. *Lancet.* 1;362(9394):1469-80. Review.

Billiar TR, Hoffman RA, Curran RD, Langehr JM and Simmons RL. **1992**. A role for inducible nitric oxide biosynthesis in the liver in inflammation and in the allogenic immune response. *J. Lab. Clin. Med.*, 120:192-197.

Bohm BA. **1998**. Extraction, purification and identification of flavonoids. In B. Ravindranath (ed.), Introduction to flavonoids. Harwood Academic Publishers, Vancouver, British Columbia, Canada.

Bradford MM. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.

Brenner Z. **1962**. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 4:389-396.

Camargo Ep. **1964**. Growth And Differentiation In *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin Of Metacyclic Trypanosomes In Liquid Media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 12:93-100.

Carlomagno M, Coura E, Pérez AC y Segura E. **1989**. Informe sobre Chagas. *Ciencia hoy.* 1(2).

Chan MM, Foge D, Ho C and Huang H. **1997**. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochem. Pharmacol.* 54:1281-1286.

Chen Z, Zhu QY, Tsang D and Huang Y. **2001**. Degradation of green tea catechins in tea drinks. *J Agric Food Chem.* 49(1):477-82

Coura JR and Castro S. **2002**. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97(1): 3-24.

Crespy V and Williamson G. **2004**. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J Nutr*. 134(12):3431S-3440S.

Croft SL. **2001**. From natural products to drugs. *Curr Opin Infect Dis*. 14(6):717-718.

De Souza W. **1999**. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94 (1)17-36.

De Souza, W. **2002**. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis*. 1:1-3.

Debrabant A, Lee N, Bertholet S, Duncan R and Nakhasi HL. **2003**. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *Int J Parasitol*. 33(3):257-267.

Deolindo P, Teixeira-Ferreira AS, Melo EJT, Veto Arnholdt AC, De Souza W, Alves EW and DaMatta RA. **2005**. Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100(1):33-8.

Dias J and Schofield C. **1999**. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery.. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94 (1):103-21.

Docampo R. **2001**. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des*. (12):1157-1164.

Docampo R, De Souza W, Miranda K, Rohloff P and Moreno SNJ. **2005**. Acidocalcisomes — conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology* 3: 251-261.

Drews J. **2000**. Drug discovery: a historical perspective. *Science*. 287(5460):1960-1964.

Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, Uhl M, Knasmueller S, Schulte-Hermann R, Berger W and Micksche M. **2005**. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J*. 19(7):807-809.

Esteva M, Ruiz AM, and Stoka AM. **2002**. *Trypanosoma cruzi*: methoprene is a potent agent to sterilize blood infected with trypomastigotes. *Exp. Parasitol*. 100:248–251.

Furukawa A, Oikawa S, Murata M, Hiraku Y and Kawanishi S. **2003** (-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. *Biochem Pharmacol.* 66(9):1769-78.

Garzoni LR, Caldera A, Meirelles Mde N, de Castro SL, Docampo R, Meints GA, Oldfield E and Urbina JA. **2004**. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents.* 23(3):273-85.

Gironés N, Cuervo H and Fresno, M. **2005** *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 296:89-123. Review.

Hamilton-Miller JM. **2001**. Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Med Microbiol.* 50(4):299-302. Review.

Henning, SM., Niu Y, Lee NH, Thames GD, Minutti RR, Wang H, Go VL and Heber D. **2004**. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *Am J Clin Nutr.* 80(6):1558-64.

Hoare CA. **1966**. The classification of mammalian trypanosomes. *Ergeb Mikrobiol Immunitätsforsch Exp Ther.*39:43-57.

Jankun J, Selamn SH, and Swiercz R. **1997**. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature.* 387:561.

Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N and Mukhtar H.. **2006**. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res.* 66(5):2500-2505.

Kolodziej H, Kayser O, Kiderlen AF, Ito H, Hatano T, Yoshida T and Foo LY. **2001**. Proanthocyanidins and related compounds: antileishmanial activity and modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$ -release in the murine macrophage-like cell line RAW 264.7. *Biol Pharm Bull.* 24(9):1016-1021.

Kosec G, Alvarez VE, Agüero F, Sanchez D, Dolinar M., Turk B, Turk V and Cazzulo, J.J. **2006**. Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: Possible candidates for programmed cell death mediators. *Mol Biochem Parasitol.* 145(1):18-28.

Krettli A, Weisz Carrington P and Neussenzweig R. **1979**. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clin.Exp.Immunol.* 37: 416-423.

Kayser O, Kiderlen AF and Croft SL. **2003**. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol Res.* 90, 2:S55-62.

Lam WH, Kazi A, Kuhn DJ, Chow LM, Chan AS, Dou QP and Chan TH. **2004**. A potential prodrug for a green tea polyphenol proteasome inhibitor:

evaluation of the peracetate ester of (-)-epigallocatechin gallate [(-)-EGCG]. *Bioorg Med Chem.* 12(21):5587-93

Lambert JD, Lee MJ, Lu H, Meng X, Hong JJ, Seril DN, Sturgill MG and Yang CS. **2003**. Epigallocatechin-3-gallate is absorbed but extensively glucuronidated following oral administration to mice. *J Nutr.* 133(12):4172-7.

Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S and Yang CS. **2002** Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (10 Pt 1):1025-32.

Liao S and Hiipakka RA. **1995**. Selective inhibition of steroid 5- reductase isozymes by tea epicatechin-3-gallate and epigallocatechin-3-gallate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214:833–838.

Lin YS, Tsai YJ, Tsay JS and Lin JK. **2003**. Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *J Agric Food Chem.* 51(7):1864-1873.

Luquetti AO, Ponce C, Ponce E, Esfandiari J, Schijman A, Revolloe S, Añez N, Zingales B, Ramgel-Aldao R, Gonzalez A, Levin, MJ, Umezawa ES and da Silveira JF. **2003**. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 46(4):265–271

Mamani-Matsuda M, Rambert J, Malvy D, Lejoly-Boisseau H, Daulouede S, Thiolat D, Coves S, Courtois P, Vincendeau P and Mossalayi MD. **2004**. Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and decreases the proinflammatory response of human macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(3):924-9.

Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, Valente PH and Paulino N. **2001**. Phenolic compounds from *Brazilian propolis* with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol.* 74(2):105-112.

Maslov DA, Podlipaev SA and Lukes J. **2001**. Phylogeny of the Kinetoplastida: Taxonomic Problems and Insights into the Evolution of Parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96(3):397-402.

Matsumoto SC, Labovsky V, Roncoroni M, Guida MC, Giménez L, Mitelman J, Gori H, Jurgelevicius R, Grillo A, Manfredi P, Levin MJ, and Paveto C. **2006**. Retinal dysfunction in patients with chronic Chagas' disease is associated to anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies that crossreact with rhodopsin *FASEB J.* 20(3):550-552

Maugeri DA and Cazzulo JJ. **2004**. The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 234(1):117-23.

- Maya JD, Bollo S, Nuñez-Vergara LJ, Squella JA, Repetto Y, Morillo A, Périé J and Chauvière G. **2003**. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. *Biochem Pharmacol.* 65(6):999-1006.
- Meng X, Sang S, Zhu N, Lu H, Sheng S, Lee MJ, Ho CT and Yang CS. **2002**. Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats. *Chem Res Toxicol.* 15(8):1042-1050.
- Moncayo, A. **2003**. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98(5): 577-591
- Morré DJ, Bridge A, Wu L and Morré DM. **2000**. Preferential inhibition by (-)-epigallocatechin-3-gallate of the cell surface NADH oxidase and growth of transformed cell in culture. *Bioche. Pharmacol.* 60:937-974.
- Morrison DA. **2002**. How to improve statistical analysis in parasitology research publications. *Int J Parasitol.* 32(8):1065-1070.
- Nie G, Cao Y and Zhao B. **2002**. Protective effects of green tea polyphenols and their major component, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Redox Rep.* 7(3):171-177.
- Nussler AK and Billiar TR. **1993**. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukocyte Biol.*,54:171-178.
- Opperdoes FR and Michels PAM. **2001**. Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. *Int J Parasitol.* 31(5-6):482-90. Review.
- Ouaisi, A. **2003**. Apoptosis-like death in trypanosomatids: search for putative pathways and genes involved. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2(1):1-5.
- Paveto C, Pereira C, Espinosa J, Montagna AE, Farber M, Esteva M, Flawiá MM and Torres HN. **1995**. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 270(28):16576-9.
- Pereira C, Alonso G, Paveto C, Iribarren A, Cabanas L, Torres H and Flawiá M. **2000**. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning: a novel energetic pathway in protozoan parasites. *J. Biol. Chem.* 275:1495-1501.
- Pereira C, Paveto C, Espinosa J, Alonso G, Flawiá MM and Torres HN. **1997**. Control of *Trypanosoma cruzi* epimastigote motility through the nitric oxide pathway. *J Eukaryot Microbiol.* 44(2):155-156
- Pereira CA Alonso GD, Ivaldi S, Silber A, Alves MJ, Bouvier LA, Flawiá MM and Torres HN. **2002**. Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. *FEBS Lett.* 526(1-3):111-1114



- Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Flawia MM and Torres HN. **1999**. L-arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol.* 46(6):566-570.
- Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Iribarren A, Cabanas ML, Torres HN and Flawiá MM.. **2000**. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. *J. Biol .Chem.* 275(2):1495-1501
- Piacenza L, Peluffo G and Radi R. **2002**. L-arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* in the regulation of programmed cell death. *Methods Enzymol*; 359:286-302
- Piacenza L, Peluffo G and Radi, R. **2001**. L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *Proc Natl Acad Sci* 98(13):7301-7306.
- Rosenthal GA, Dahlman DL and Robinson GW. **1977**. L-Arginine kinase from tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). Purification, properties, and interaction with L-canavanine. *J Biol Chem.* 252(11):3679-3683.
- Schijman AG, Altchek J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ and Freilij H. **2003** Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother.* 52(3):441-449.
- Sepúlveda-Boza S. and Cassels B.K. **1996**. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med.* 62(2):98-105.
- Silber AM, Colli W, Ulrich H, Manso Alves MJ and Pereira CA. **2005** Amino Acid Metabolic Routes in *Trypanosoma cruzi*: Possible Therapeutic Targets Against Chagas' Disease. *Current Drug Targets – Infectious Disorders*, 5(1): 53-64
- Steverding D and Tyler KM. Novel antitrypanosomal agents *Expert Opin Investig Drugs.* **2005**. 14(8):939-955
- Tyler KM and Engman MD. **2001**. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* (5-6):472-481.
- TDR, Tropical Disease Research. **2005**. Making health research for poor people. Chagas' disease. Seventeenth Programme Report. Progress 2003-2004 (<http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/pr17/pr17.pdf> ). p: 30-33
- Urbina JA. **2003**. New chemotherapeutic approaches for the treatment of Chagas disease (American Trypanosomiasis). *Exprt Opin Ther Patents.* 13 (5):661-669.

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

Urbina JA. **2002**. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des.* 8(4):287-95. Review.

Wang R and Zhou W. **2004**. Stability of tea catechins in the breadmaking process. *J Agric Food Chem.* 52(26):8224-8229

Wang X, and Tian W. **2001**. Green tea epigallocatechigallate: a natural inhibitor of fatty-acid synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 288:1200–1206.

Weniger B, Robledo S, Arango GJ, Deharo E, Aragon R, Munoz V, Callapa J, Lobstein A and Anton R. **2001**. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J Ethnopharmacol.* 78(2-3):193-200.

WHO, World Health Organization (<http://www.who.int/en/>)

A. <http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>

B. <http://www.who.int/ctd/chagas/geo.htm>

C. <http://www.who.int/ctd/chagas/epidemio.htm>

D. <http://www.who.int/ctd/chagas/lifecycle.htm>

E. <http://www.who.int/ctd/chagas/elimination.htm>

Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl PD and Isola ELD. **2002**. Regulation of *Trypanosoma cruzi* Invasion of Nonphagocytic Cells by the Endocytically Active GTPases Dynamin, Rab5, and Rab7. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 291: 516-521.

Wynne de Martini GJ, Abramo Orrego L, de Rissio AM, Alvarez M and Mujica LP. **1980**. Culture of *Trypanosoma cruzi* in a monophasic medium. Application to large-scale cultures in fermentation processes. *Medicina* 40 (1)109-14.

Yamamoto, T. **1997**. Chemistry and application of green tea. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Yang CS, Hong J, Hou Z and Sang S. **2004**. Green tea polyphenols: antioxidative and prooxidative effects. *J Nutr.* 134(11):3181S

Yang B, Arai K and Kusu F. **2000**. Determination of catechins in human urine subsequent to tea ingestion by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Biochem.* 283:77–82.

Zhu M, Chen Y and Li RC. **2000**. Oral absorption and bioavailability of tea catechins. *Planta Med.* 66(5):444-447.

# *Anexo*

## TABLAS DE EQUIVALENCIAS

Catequina	PM
C	290
EC	290
GC	306
EGC	306
Cg	442
ECg	442
GCg	458
EGCg	458

**Tabla 1:** Peso molecular de las catequinas

Catequina	IC <sub>50</sub> (pM)	IC <sub>50</sub> (pg/ml)
GCg	0.12	0.055
EGCg	0.53	0.243
GC	10.5	3.23
EGC	13	4
Cg	48	21.2
ECg	56	24.8
C	67	19.4
EC	85	26.6

**Tabla 2:** Equivalencia entre las distintas formas de expresar los valores de IC<sub>50</sub> sobre tripomastigotes sanguíneos.

Catequina	≈ IC <sub>50</sub> (nM)	≈ IC <sub>50</sub> (pg/ml)
GCg	100	45.8
EGCg	100	45.8

**Tabla 3:** Equivalencia entre las distintas formas de expresar los valores aproximados de IC<sub>50</sub> sobre la inhibición de la infección de células Vero por tripomastigotes de cultivo, y de la inhibición de la replicación de amastigotes por GCg y EGCg.

Catequina	IC <sub>50</sub> (mM)	IC <sub>50</sub> (pg/ml)
EGCg	0.311	152.4

**Tabla 4:** Equivalencia entre las distintas formas de expresar los valores de IC<sub>50</sub> sobre la inhibición del crecimiento de epimastigotes de cultivo por EGCg.

Vía de administración	Agregado	µg/ratón	mg/kg/dosis	Cantidad de EGCg en plasma (µg)	Concentración en plasma (µg/ml)	Concentración en plasma (molaridad)
i.p.	EGCg	4.4	0.16	0.044-1.32	0.0176-0.528	0.038-1.15 µM
	EGCg	22	0.8	0.22-6.6	0.088-0.264	0.19-5.75 µM
	EGCg	55	2	0.55-16.5	0.22-6.6	0.48-14.4 µM
	EGCg	110	4	1.1-32.5	0.44-13.2	0.96-28.8 µM
v.o.	EGCg	110	4	0.011-0.325	0.0044-0.132	9.6-288 nM
	EGCg	220	8	0.022-0.660	0.0088-264	19.2-576 nM
	Polifenón 60	440	16	-	-	-
	Polifenón 60	880	32	-	-	-

**Tabla 5:** Equivalencia entre las distintas formas de expresar la cantidad de EGCg administrada a los ratones BALB/c en los experimentos de actividad tripanocida *in vivo*, y la concentración esperada en plasma.