



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio de los transportadores de poliaminas de
Trypanosoma cruzi y su relación con las drogas
antichagásicas**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Chantal Reigada

Director de tesis: Dr. Claudio Alejandro Pereira

Consejero de estudios: Dr. Guillermo Daniel Alonso

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari (IDIM, CONICET-
UBA)

Buenos Aires, 2018

RESUMEN

Estudio de los transportadores de poliaminas de *Trypanosoma cruzi* y su relación con las drogas antichagásicas

Las poliaminas, principalmente putrescina y espermidina, son metabolitos esenciales para la supervivencia de *Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Particularmente este parásito es incapaz de sintetizar poliaminas *de novo* por carecer de las enzimas involucradas en el primer paso de su biosíntesis y por lo tanto, son obtenidas exclusivamente del medio extracelular por mecanismos de transporte. En este contexto, la presente tesis tuvo como objetivo profundizar el estudio del transportador de poliaminas de *T. cruzi* denominado TcPAT12, con el propósito de evaluarlo como posible blanco terapéutico de aplicación en la enfermedad de Chagas.

Utilizando un modelo de parásitos que sobre-expresan TcPAT12 se demostró que es un transportador de putrescina y espermidina. La sobre-expresión de la permeasa produjo un incremento, no sólo en la concentración intracelular de las poliaminas, sino también en la resistencia a estrés generado por peróxido de hidrógeno y por las drogas tripanocidas, nifurtimox y benznidazol.

Además, se identificaron diferentes inhibidores del transporte de poliaminas con actividad tripanocida. Entre ellos, se determinó que la pentamidina, una droga utilizada para tratar la leishmaniasis y la tripanosomiasis Africana, tuvo efectos contra *T. cruzi*, tanto *in vitro* como *in vivo*, y probablemente estén relacionados en parte con su capacidad para inhibir el transporte de poliaminas. También se descubrió otro agente antichagásico denominado isotretinoína, usando el TcPAT12 como blanco para el reposicionamiento de drogas mediante la técnica de rastreo virtual. Se demostró que este retinoide, disponible en el mercado como fármaco para el tratamiento de acné, inhibió el transporte de putrescina y otros transportadores de aminoácidos de *T. cruzi* de la familia AAAP (*Amino Acid/Auxin Permeases*) presentando una fuerte actividad tripanocida en todos los estadios del ciclo de vida ensayados. De la misma manera se evaluaron análogos sintéticos de poliaminas demostrándose que un conjugado de antraceno con putrescina denominado Ant4, diseñado para el tratamiento contra el cáncer, inhibió el transporte de poliaminas y presentó actividad tripanocida.

En función de los resultados obtenidos podemos concluir que los transportadores de poliaminas de *T. cruzi* son vías de ingreso para drogas tripanocidas y blancos terapéuticos prometedores para el desarrollo de nuevos tratamientos contra la enfermedad de Chagas.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, poliaminas, transporte de poliaminas, TcPAT12, identificación de drogas, pentamidina, isotretinoína, análogos de poliaminas.

SUMMARY

Study of polyamine transporters of *Trypanosoma cruzi* and its relationship with antichagasic drugs

Polyamines, mainly putrescine and spermidine, are essential metabolites for *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. In the specific case of *T. cruzi*, this parasite cannot synthesize polyamines *de novo* due to the lack of the enzymes involved in the first step of its biosynthesis, therefore, the intracellular availability of these molecules depends exclusively on transport processes. For these reasons, in this thesis, a polyamine transporter of *T. cruzi*, called TcPAT12, was further characterized in order to evaluate it as a putative therapeutic target for its possible application in the therapy of Chagas disease.

TcPAT12 was overexpressed in *T. cruzi* epimastigotes and it was demonstrated that it is a putrescine and spermidine transporter. The overexpression of the permease produced an increase, not only in the intracellular concentration of polyamines, but also in the stress resistance generated by hydrogen peroxide and by the trypanocidal drugs nifurtimox and benznidazole.

On the other hand, different inhibitors of polyamine transport with trypanocidal activity were identified. Among them, pentamidine, a drug used to treat leishmaniasis and African trypanosomiasis, was shown to be effective against *T. cruzi*, both *in vitro* and *in vivo*, and probably its mechanism of action was related, at least in part, to the inhibition of the polyamine transport in the parasite. Another antichagasic agent called isotretinoin was identified by virtual screening using the permease TcPAT12 as target for drug repositioning. This retinol derivative, used in the treatment of severe acne, inhibited the putrescine transport as well as other amino acid transporters from the *T. cruzi* protein family AAAP (*Amino Acid/Auxin Permeases*). Isotretinoin also had a strong trypanocidal activity in all stages of the parasite life cycle tested. In addition, synthetic polyamine analogs were evaluated, demonstrating that an anthracene-putrescine conjugate designed for cancer treatment and named Ant4, inhibited the polyamine transport in *T. cruzi* parasites and also presented trypanocidal activity.

Based on the obtained results, the *T. cruzi* polyamine transporters are entry ways for trypanocidal drugs as well as promising therapeutic targets for development of new treatments against Chagas disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, polyamines, polyamine transport, TcPAT12, drug discovery, pentamidine, isotretinoin, polyamine analogs.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Claudio por dirigirme durante estos años, por la oportunidad, su confianza, por su paciencia.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por los medios para realizar esta tesis.

A Marian, Meli y Fabio, por su ayuda en los ensayos experimentales, por guiarme en estos años, por tantas horas compartidas... por su amistad.

A Edward, por su gran ayuda en la bioinformática, por su buena predisposición.

A las chicas del labo de apoptosis, en especial a Fer, por su colaboración en el trabajo con células.

A mis amigas, por estar siempre, aun en la distancia.

A mi familia, a mis papás, a Nico, por todo... por su apoyo incondicional.

A mis papás

A Nico

Contenido

Abreviaturas	13
I-Introducción	15
Enfermedad de Chagas	16
Generalidades, epidemiología y situación actual.....	16
Formas de transmisión	17
Manifestaciones clínicas.....	18
Diagnóstico y control de la enfermedad	18
Tratamiento.....	20
<i>Trypanosoma cruzi</i>	22
Clasificación.....	22
Ciclo de vida	23
Biología celular	25
El genoma.....	28
Regulación de la expresión génica	29
Poliaminas	30
Características generales.....	30
Metabolismo de poliaminas en tripanosomátidos	32
Transporte de metabolitos	36
Generalidades	36
Transportadores en tripanosomátidos	38
Transporte de poliaminas.....	43
II-Hipótesis y objetivos	46
III-Materiales y métodos	48
Soluciones.....	49
Medios de cultivo	50
Organismos.....	51
Manipulación de células de mamíferos	51

Cultivos de células Vero y CHO-K1	51
Ensayos de citotoxicidad de isotretinoína y Ant4 sobre células de mamíferos.....	52
Manipulación de bacterias	52
Cultivo de bacterias.....	52
Bacterias competentes.....	52
Transformación de bacterias.....	53
Manipulación de parásitos	53
Cultivos de <i>T. cruzi</i>	53
Evaluación de la actividad tripanocida.....	54
Ensayo de viabilidad por reducción del compuesto MTT (sal de tetrazolio)	56
Determinación de tioles en epimastigotes tratados con pentamidina.....	56
Transfección de epimastigotes y selección	56
Manipulación y obtención de ADN	57
Preparación de ADN genómico de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	57
Preparación de ARN total de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	57
Obtención de ADN plasmídico	57
Secuenciación de ADN.....	58
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	58
Transcripción Reversa y amplificación mediante PCR (RT-PCR).....	59
Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	59
Preparación de vectores y fragmentos de ADN	59
Ligación de fragmentos de ADN	59
Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	59
Técnicas para análisis de proteínas	60
Preparación de extractos de epimastigotes.....	60
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturizantes (SDS-PAGE)	60
Western blot	60
Ensayos con un modelo de parásitos sobre-expresando el transportador de poliaminas TcPAT12	61

Determinación de la concentración de poliaminas intracelulares.....	61
Efectos de la disponibilidad de poliaminas sobre el crecimiento de los parásitos	61
Tratamiento con peróxido de hidrógeno	61
Tratamiento con drogas tripanocidas	62
Medición de tioles.....	62
Estudios de la isotretinoína en <i>T. cruzi</i>	62
Preparación de la droga	63
Ensayo de permeabilidad de la membrana plasmática	63
Determinación del mecanismo tripanocida en epimastigotes	63
Estudios utilizando análogos sintéticos de poliaminas en <i>T. cruzi</i>	65
Preparación de los compuestos	66
Tratamientos combinados de Ant4 y benznidazol.....	66
Ensayos de transporte.....	66
Transporte de metabolitos en <i>T. cruzi</i>	67
Plásmidos utilizados	68
Construcciones genéticas.....	70
Técnicas bioinformáticas.....	71
Búsqueda de secuencias y análisis predictivos	71
Rastreo virtual (<i>virtual screening</i>)	71
Análisis estadístico	74
IV-Resultados	75
Capítulo 1. Estudio del transportador de poliaminas de <i>T. cruzi</i> TcPAT12	76
1.1 Análisis de la secuencia de TcPAT12	76
1.2 Caracterización de un modelo de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> que sobre-expresan el TcPAT12	80
1.3 Medición de poliaminas intracelulares	82
1.4 Efecto de la sobre-expresión del TcPAT12 en el crecimiento de los parásitos	84
1.5 Sobre-expresión de TcPAT12 y resistencia a estrés	85
1.6 Contenido de tioles en parásitos que sobre-expresan TcPAT12.....	86

1.7 Otros posibles transportadores de poliaminas	87
1.7.1 Identificación de genes de posibles transportadores de poliaminas en tripanosomátidos	87
1.7.2 Análisis de las secuencias de TcPT-2/6.....	89
Capítulo 2. Búsqueda de drogas tripanocidas que inhiban el transporte de poliaminas de <i>T. cruzi</i>.....	94
2.1 Evaluación de la pentamidina en <i>T. cruzi</i>	94
2.1.1 Efecto tripanocida	95
2.1.2 Efecto sobre el transporte de poliaminas	96
2.1.3 Evaluación de la pentamidina en parásitos sobre-expresando el TcPAT12.....	98
2.2 Búsqueda de inhibidores del transportador de poliaminas TcPAT12 mediante reposicionamiento por rastreo virtual.....	100
2.2.1 Estudios de rastreo virtual	101
2.2.2 Efecto de la isotretinoína y otros retinoides en el transporte de poliaminas.....	107
2.2.3 Efecto de la isotretinoína en otros sistemas de transporte	108
2.2.4 Evaluación de la isotretinoína sobre la membrana plasmática del parásito	109
2.2.5 Evaluación de la actividad tripanocida de la isotretinoína.....	110
2.2.6 Determinación del mecanismo tripanocida de la isotretinoína.....	113
2.3 Prueba de análogos sintéticos de poliaminas	119
2.3.1 Estructuras de los análogos de poliaminas	119
2.3.2 Efecto sobre el transporte de poliaminas en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	121
2.3.3 Efecto tripanocida	123
2.3.4 Efecto del análogo Ant4 sobre el transporte de poliaminas en tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	125
2.3.5 Influencia de Ant4 sobre el efecto del benznidazol	126
V-Discusión	127
El transportador de poliaminas TcPAT12	129
Poliaminas y resistencia a estrés.....	131
Otros transportadores de poliaminas	132
Inhibidores del transporte de poliaminas	133
Pentamidina	134

Isotretinoína	136
Análogos de poliaminas	138
VI-Conclusiones.....	143
VII-Bibliografía	146
VIII-Anexos	162
Anexo 1.....	163
A.1.1. Curva de crecimiento de epimastigotes que sobre-expresan GFP en medio BHT	163
A.1.2. Sobre-expresión de TcPAT12 y resistencia a estrés generado por peróxido de hidrógeno y drogas tripanocidas.....	163
Anexo 2.....	165
A.2 Matriz de similitud basada en el coeficiente de Tanimoto.....	165
Anexo 3.....	166
A.3 Difusión de los resultados	166

Abreviaturas

AAAP, *amino acid/auxin permease* (permeasa de aminoácidos/auxinas)

ADN, ácido desoxirribonucleico

ADNasa, desoxirribonucleasa

ADNc, ADN copia

ADNss, ADN *single-stranded* (monocatenario)

ARN, ácido ribonucleico

ARNm, ARN mensajero

ARNr, ARN ribosomal

ARNsn, ARN *small nuclear* (pequeño nuclear)

ARNt, ARN de transferencia

ATP, adenosín trifosfato

BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool* (Herramienta de alineamiento local)

BSA, *bovine serum albumine* (seroalbúmina bovina)

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

DIC, *differential interference contrast* (contraste diferencial de interferencia)

DMSO, dimetil-sulfóxido

DNDi, *Drug for Neglected Disease initiative* (iniciativa Medicamentos para Enfermedades Olvidadas)

DO, densidad óptica

DS, desvío estándar

DTT, ditioneitol

EDTA, ácido etilendiaminotetraacético

FDA, *Food and Drug Administration* (Administración de alimentos y drogas)

FITC, isotiocianato de fluoresceína

GDH, glutamato deshidrogenasa

GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (también llamada GPD)

GFP, *green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)

HPLC, *high performance liquid chromatography* (cromatografía líquida de alta presión)

IPTG, isopropil-beta-D-tiogalactopiranósido

MTT, bromuro difeniltetrazolium dimetiltiazol

pb, pares de bases

PBS, *phosphate buffered saline* (buffer fosfato salino)

PCR, *polimerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

PEG, polietilenglicol

PVDF, *polyvinylidene difluoride* (membrana de di-fluoruro de polivinilideno)

ROS, *reactive oxygen species* (especies reactivas del oxígeno)

RT-PCR, *reverse transcriptase PCR* (transcripción reversa seguida de PCR)

SDS, sodium dodecyl sulfate (dodecilsulfato sódico)

SFB, suero fetal bovino

SL, *spliced leader* (mini-exón)

spp., especies

TAE, buffer tris acetato EDTA

TAU, triatomine artificial urine (orina artificial de triatomo)

U, unidades enzimáticas (volumen de enzima que digiere un μg de ADN por hora, a temperatura óptima)

UA, unidades arbitrarias

UDT, *discrete typing unit* (unidad discreta de tipificación)

WHO, *World Health Organization* (Organización Mundial de la Salud)

WT, *wild type* (genotipo silvestre)

X-Gal, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

I-Introducción

Enfermedad de Chagas

Generalidades, epidemiología y situación actual

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una zoonosis causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*. Fue descubierta, junto a su agente etiológico y vector trasmisor, en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas (Chagas, 1909). En la década de 1920, el médico y bacteriólogo argentino Salvador Mazza difundió la existencia de la enfermedad a nivel mundial y realizó numerosos estudios sobre su sintomatología y lesiones (Zabala, 2009). La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria crónica sistémica que pasa por distintas etapas en su curso natural. Es considerada una enfermedad endémica, potencialmente mortal, que prevalece mayoritariamente en las regiones rurales más pobres en donde las condiciones de vida precarias facilitan la transmisión vectorial del parásito (Barrett *et al.*, 2003). Esta infección es uno de los problemas de salud pública más preocupantes en América Latina; el costo total anual de su tratamiento es de aproximadamente 7 mil millones de dólares (Pinheiro *et al.*, 2017).

La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países del continente americano, desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Chile. Se estima que en el mundo existen entre 6 y 7 millones de personas infectadas (World Health Organization, 2015). Según las estimaciones basadas en datos del año 2010, Argentina, Brasil y México fueron los tres países con el mayor número de personas infectadas, seguido por Bolivia (World Health Organization, 2015). En Argentina existen al menos 1.600.000 personas infectadas, casi el 4% de la población total del país y alrededor de 300.000 personas sufren afecciones cardíacas asociadas con esta enfermedad (Informe de la Auditoría General de la Nación del año 2012, https://www.agn.gov.ar/files/informes/2012_020info.pdf).

La enfermedad de Chagas es actualmente una epidemia global debido a la migración de individuos portadores del parásito a regiones no endémicas como Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental (Figura 1). En Estados Unidos se estima la existencia de 300.000 inmigrantes infectados (Pérez-Molina & Molina, 2018).

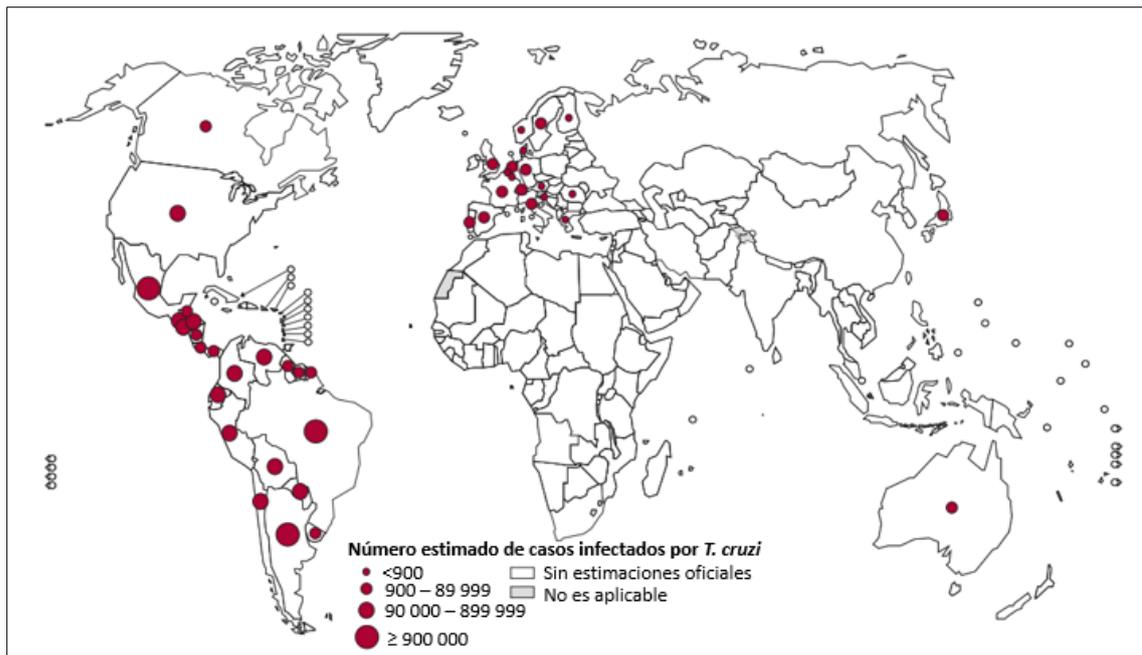


Figura 1. Distribución global de casos de la enfermedad de Chagas, basados en estimaciones oficiales, 2006 – 2010. Adaptado de la Organización Mundial de la Salud (<http://www.who.int/chagas/>).

La tabla 1 resume los datos indicadores de la progresión de la enfermedad de Chagas entre 1980 y 2010 en América Latina.

	1980-85	2005	2010
Población en riesgo (% total)	92.895.000 (25%)	108.595.000 (20,4%)	70.199.360 (12,9%)
Número de personas infectadas	17.395.000	7.694.500	5.742.167
Número de nuevos casos por año	700.000	55.585	38.593
Transmisión congénita	7.000-49.000	14.385	8.668
Transmisión vectorial	No reportado	41.200	29.925
Número de muertes por año	>45.000	12.500	12.000

Tabla 1. Cambios en la prevalencia, incidencia y mortalidad de la enfermedad de Chagas, entre 1980 y 2010, en 21 países endémicos en América Latina. Adaptado de Pérez-Molina y col. (2018).

Formas de transmisión

T. cruzi es transmitido al hombre en áreas endémicas por varias especies de tres géneros de insectos hematófagos, denominados comúnmente triatomíneos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae: *Panstrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius*. Los tres géneros están ampliamente distribuidos en América Latina, desde México hasta Argentina y Chile, y habitan áreas tanto boscosas como secas (Pérez-Molina & Molina, 2018). La especie *Triatoma infestans* es la más común en Argentina, donde generalmente es conocida como vinchuca. El reservorio natural del parásito lo constituyen los

murciélagos, zarigüeyas, ratas, primates silvestres, además de ciertos animales domésticos como perros, gatos, cobayos y otros mamíferos pequeños (Clayton, 2010a). El parásito también se puede transmitir verticalmente de la madre infectada al feto, por transfusión de sangre contaminada y por trasplante de órganos provenientes de una persona infectada. Otras formas de transmisión menos frecuentes involucran la ingesta de alimentos contaminados con el parásito (transmisión oral) y accidentes de laboratorio (Pérez-Molina & Molina, 2018).

Manifestaciones clínicas

En cuanto a la evolución clínica de la enfermedad de Chagas se pueden distinguir dos fases: aguda y crónica con su forma indeterminada (asintomática) y su forma con manifestaciones clínicas (Coura, 2007).

-La *fase aguda*, caracterizada por la presencia de una elevada parasitemia, se extiende entre 4 y 8 semanas. En la mayoría de los casos es asintomática, aunque pueden presentarse manifestaciones clínicas, caracterizadas por: inflamación edematosa en el sitio de la infección (chagoma), signo de Romaña cuando la conjuntiva es la puerta de entrada, fiebre, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, anorexia y miocarditis.

-Luego de dicha etapa, la enfermedad pasa a ser *crónica sin sintomatología clínica* (forma indeterminada). Un 70 % de los infectados continúan en ese estado por el resto de sus vidas, caracterizado por una baja parasitemia y la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*. El 30 % puede evolucionar a una *forma crónica con manifestaciones clínicas* como cardiopatía, lesiones digestivas (megaesófago y megacolon) o desórdenes neurológicos después de 10 a 25 años de la infección inicial (Barrett *et al.*, 2003).

Diagnóstico y control de la enfermedad

Durante la fase aguda, la infección se diagnostica por la presencia de síntomas clínicos y mediante métodos parasitológicos que se basan en la búsqueda del *T. cruzi* en las muestras sanguíneas. Los mismos incluyen los métodos directos de observación del parásito en sangre y los indirectos que permiten la detección del parásito luego de su amplificación. Dentro de estos últimos se encuentran el xenodiagnóstico, el hemocultivo y los métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Bulcão Portela-Lindoso & Aparecida Shikanai-Yasuda, 2003; Chiari *et al.*, 1989; Antas *et al.*, 1999). En la fase crónica asintomática, los métodos parasitológicos presentan menor sensibilidad debido a la reducida parasitemia, aunque la infección puede diagnosticarse por métodos

serológicos, basados en la detección de anticuerpos generados contra diferentes antígenos del parásito, usualmente de las subclases IgG1 e IgG3 (Rottenberg *et al.*, 1991). Los métodos de serología convencional más aplicados en el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* son: hemoaglutinación indirecta (HAI), inmunoensayo enzimático (ELISA) e inmunofluorescencia indirecta (IFI).

En la actualidad no existe una vacuna contra *T. cruzi*. Desde principios de la década de 1990, la medida más efectiva para el control de esta enfermedad en América Latina ha sido la intervención de la transmisión vectorial mediante la eliminación del insecto de las viviendas y sus alrededores. Como se muestra en la Figura 2, la transmisión vectorial fue interrumpida en Uruguay en 1997, en Chile en 1999 y supuestamente en gran parte de Brasil en el 2000 (World Health Organization, 2002; Salvatella *et al.*, 2014). Actualmente existen diferentes métodos y estrategias para el control vectorial, como insecticidas piretroides de efecto residual, nuevos materiales de construcción para la modificación de las viviendas rurales, cajas sensoras para la detección de reinfestaciones domiciliarias, entre otros (World Health Organization & Mundo Sano, 2007). También se hace énfasis en la detección de la infección en dadores que concurren a los bancos de sangre, en la detección y tratamiento de la transmisión congénita y en la administración de tratamientos a los casos agudos y a los niños (Pérez-Molina & Molina, 2018). Además, se propone fortalecer los sistemas mundiales de vigilancia e información epidemiológicos.

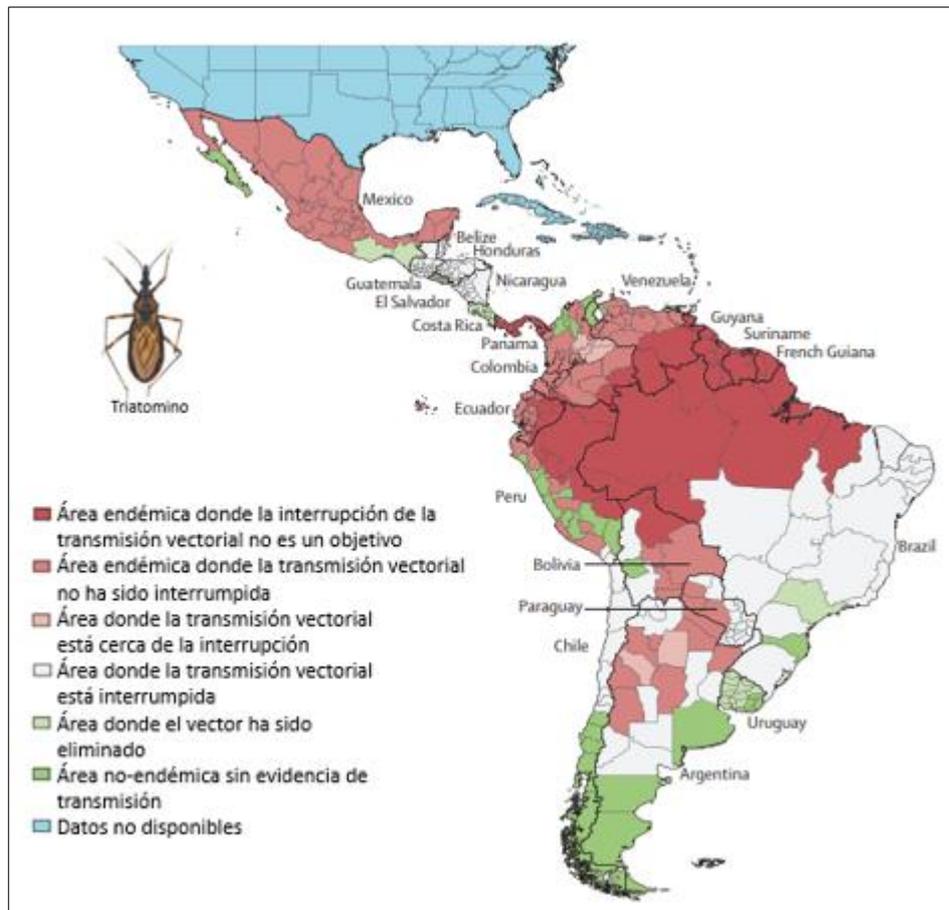


Figura 2. Transmisión de la enfermedad de Chagas por el vector triatomino (septiembre, 2014). Adaptado de Pérez-Molina y col. (2018).

Tratamiento

Los únicos medicamentos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el benznidazol (Rochagan[®], Radanil[®], Abarax[®]) un derivado nitroimidazólico, lanzado por Roche en 1972 y el nifurtimox (Lampit[®]), un derivado de nitrofurano, lanzado por Bayer en 1967 (Figura 3). No está del todo claro el mecanismo de acción de estos compuestos. Se asume que la actividad antiparasitaria de nifurtimox está asociada con la producción de grandes cantidades de radicales libres de oxígeno altamente tóxicos, como anión superóxido y peróxido de hidrógeno; también se ha descrito un mecanismo alternativo que implica la reducción de la droga por una nitrorreductasa tipo I del parásito que conduce a la formación del producto tóxico nitrilo insaturado de cadena abierta (Urbina, 2010; Hall *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha propuesto que la activación del benznidazol mediante una nitrorreductasa tipo I conduce a la formación de metabolitos reductores que pueden causar una serie de efectos nocivos como el daño a nivel del ADN. También se propuso a través de un análisis de metabolómica que la unión covalente de benznidazol con tioles de bajo peso molecular

y con tioles proteicos sería la principal causa de toxicidad de la droga contra *T. cruzi* (Urbina, 2010; Hall & Wilkinson, 2012; Trochine *et al.*, 2014). Ambas drogas son eficaces en el tratamiento de la infección congénita y en casos de infección aguda. Sin embargo, requieren terapias prolongadas de 60-90 días, con tasas de curación de hasta 80%, y no se consideran efectivas en pacientes con infección crónica por más de 10 años. Además, producen serios efectos secundarios como erupciones cutáneas, náuseas, daño hepático y convulsiones, entre otros (Barrett *et al.*, 2003; Clayton, 2010a); siendo necesario el desarrollo de nuevas drogas con un perfil farmacológico más adecuado.

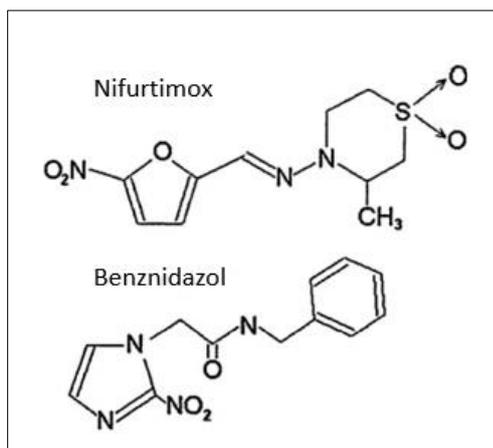


Figura 3. Estructura química de las drogas actualmente disponibles para la enfermedad de Chagas, nifurtimox y benznidazol. (Urbina, 2010).

Una estrategia diferente es la de evaluar drogas que ya están aprobadas para otros fines terapéuticos. Los fármacos antifúngicos, posaconazol y E1224 (prodroga de ravuconazol), inhibidores de la síntesis del ergosterol, demostraron cura parasitológica en modelos experimentales de la enfermedad de Chagas (Urbina, 2015). Sin embargo, cuando se evaluó la efectividad del posaconazol en el tratamiento de la infección crónica en comparación con el benznidazol, se obtuvo un elevado porcentaje de falla terapéutica (ensayos CHAGASAZOL y STOP-CHAGAS) (Molina *et al.*, 2014; Morillo *et al.*, 2017). E1224 mostró un efecto transitorio y supresor sobre la eliminación del parásito en adultos con Chagas crónico indeterminado, considerándolo como una posible terapia combinada con benznidazol (Torrico *et al.*, 2018). Por otro lado, el estudio BENEFIT (*BENZnidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis*) no mostró evidencias de que la droga redujese la gravedad de los síntomas cardíacos en pacientes con Chagas crónico, luego de 5 años de seguimiento (Morillo *et al.*, 2015). En los últimos años se han venido desarrollando varios potenciales compuestos tripanocidas que podrían contribuir a resolver este dilema, como por ejemplo el fexinidazol, un nitroimidazol que se demostró que es efectivo en un modelo de infección experimental aguda y crónica de la enfermedad de Chagas (Bahia *et al.*, 2014; Sales Junior *et al.*, 2017).

Trypanosoma cruzi

Clasificación

La ubicación taxonómica de *T. cruzi* es la siguiente (Levine *et al.*, 1980):

- Reino:** Protista
- Subreino:** Protozoa
- Filo:** Sarcomastigofora
- Clase:** Zoomastigofora
- Orden:** Kinetoplastida
- Familia:** Trypanosomatidae
- Género:** *Trypanosoma*
- Subgénero:** *Schizotripanum*
- Especie:** *T. (S.) cruzi*

Todos los miembros del orden Kinetoplastida se caracterizan por la presencia de una organela peculiar conocida como kinetoplasto (ver más adelante en esta sección). Los integrantes de la familia Trypanosomatidae, conocidos como tripanosomátidos, incluyen parásitos de plantas, invertebrados y vertebrados. Entre estos últimos se encuentran géneros con especies causantes de enfermedades en humanos, cuyos miembros más importantes son además de *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* y *Trypanosoma brucei gambiense*, agentes causales de la tripanosomiasis Africana humana y *Leishmania spp.*, causante de la leishmaniasis visceral, mucocutánea y cutánea. A su vez, el género *Trypanosoma* comprende otros organismos patógenos de animales de ganado y que ocasionan grandes pérdidas económicas, entre éstos, *T. brucei brucei*, *T. vivax* y *T. congolense* (Simpson *et al.*, 2006).

T. cruzi es una especie heterogénea con alta diversidad genética y fenotípica, que ha sido clasificada en seis unidades discretas de tipificación (UDTs, TcI-TcVI). Estas UDTs se definen como un conjunto de cepas que se encuentran genéticamente más relacionadas entre sí que con cualquier otra cepa y que son identificadas por medio de marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos. Esta diversidad genética ha sido asociada con diferentes distribuciones geográficas y ciclos de transmisión (Zingales *et al.*, 2009).

Ciclo de vida

T. cruzi presenta un ciclo de vida digenético, alternando entre dos hospedadores distintos, uno invertebrado y otro vertebrado. Este parásito unicelular presenta diferentes morfologías a lo largo de su ciclo de vida según las características del flagelo y la ubicación relativa del kinetoplasto respecto del núcleo. A continuación se definen tres estadios principales:

-*Tripomastigote*: forma alargada de 25 μm de largo, flagelada, no replicativa, infectiva. Kinetoplasto de localización posterior al núcleo (Figura 4). Se encuentra en los tejidos y en la sangre del hospedador vertebrado, en el intestino posterior, heces y orina del invertebrado, en la fase estacionaria de crecimiento en cultivos axénicos y en fase líquida de cultivos celulares. Se denominan tripomastigotes sanguíneos a las formas circulantes en el vertebrado y metacíclicos a las formas infectivas en el invertebrado. (De Souza, 2002).

-*Epimastigote*: forma alargada de 20-40 μm de largo, flagelada, replicativa, no infectiva. Kinetoplasto de localización anterior al núcleo (Figura 4). Se encuentra en el intestino del hospedador invertebrado (De Souza, 2002). Son fácilmente cultivados *in vitro* en medio líquido.

-*Amastigote*: forma redondeada, con flagelo corto que no protruye fuera del bolsillo flagelar (Figura 4). Se localiza intracelularmente y constituye la forma replicativa en el mamífero (De Souza, 2002).

El epimastigote intracelular es un estadio transiente en el proceso de diferenciación de amastigote a tripomastigote sanguíneo, y comparte características con ambos, aunque sus propiedades predominantes, incluyendo la morfología general, son similares al epimastigote (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999).

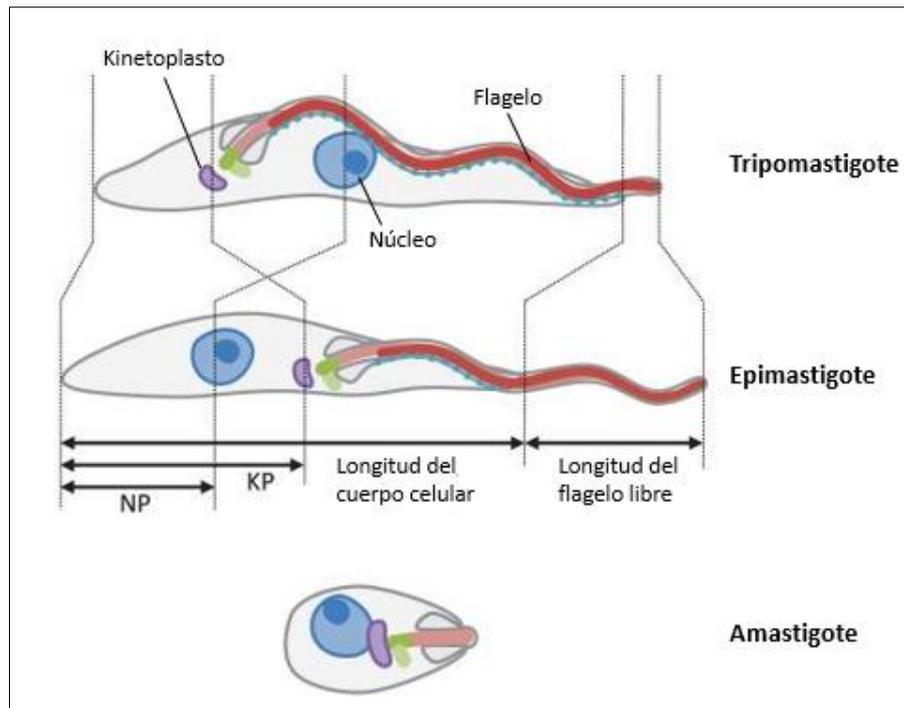


Figura 4. Esquema de los distintos estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. Los mismos están definidos por la forma, longitud del flagelo, posición del núcleo y kinetoplasto. KP: distancia posterior del kinetoplasto, NP: distancia posterior del núcleo. Adaptado de Wheeler y col. (2013).

El ciclo comienza cuando el parásito, en su forma tripomastigote sanguíneo circulante, es ingerido por el insecto vector a partir de un humano o animal infectado junto con la sangre. El mismo ingresa al tracto digestivo donde se diferencia al estadio epimastigote que se multiplica por fisión binaria formando un reservorio de parásitos en este hospedador. Los epimastigotes migran por el tracto digestivo hasta llegar al recto donde se adhieren y diferencian a tripomastigotes metacíclicos, que son liberados con las heces cuando el insecto se alimenta. Esta última forma es la que inicia la infección en el humano ingresando al organismo por las mucosas o heridas en la piel. Cuando ingresa a la célula se diferencia a amastigote, se multiplica por fisión binaria y posteriormente se diferencia a tripomastigote sanguíneo, que es liberado al torrente sanguíneo por la lisis celular. Estos pueden infectar nuevamente células o ser ingeridos por el insecto vector durante una nueva alimentación, cerrando el ciclo de vida (Figura 5) (Tyler & Engman, 2001).

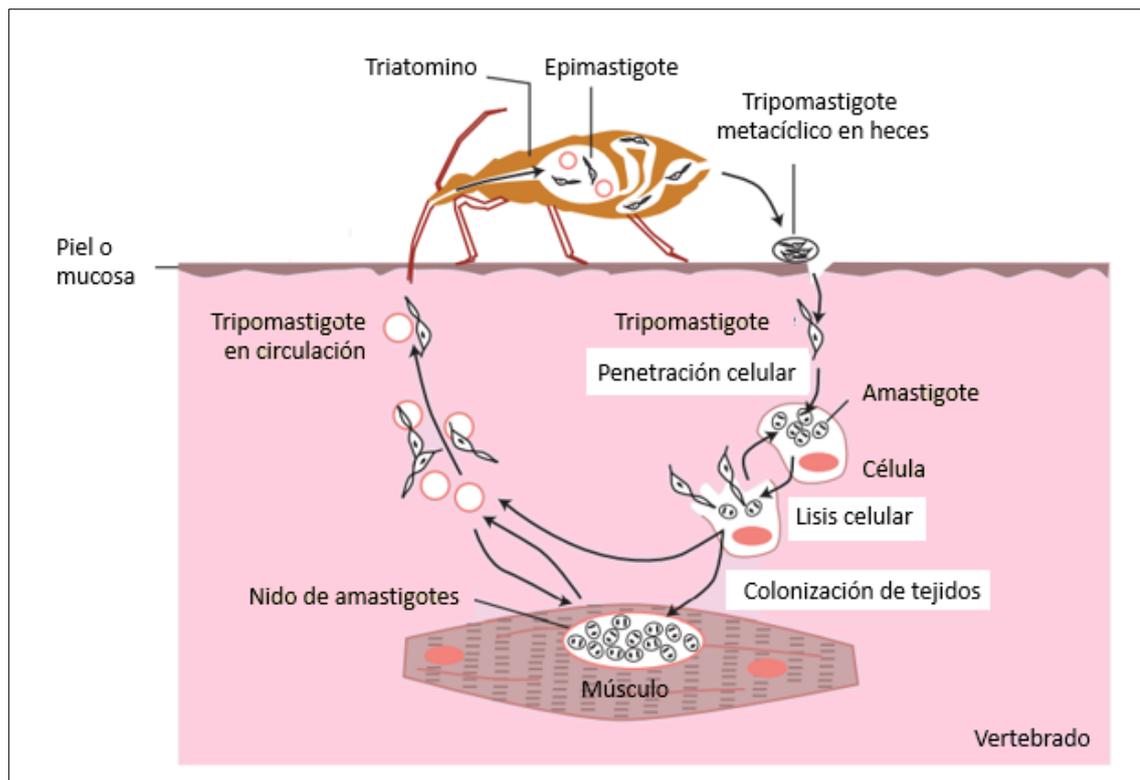


Figura 5. Esquema simplificado del ciclo de vida de *T. cruzi*. Parte superior: estadios dentro del vector triatomo, epimastigote (replicativo, no infeccioso) y tripomastigote metacíclico (no replicativo, infeccioso). Parte inferior: estadios dentro del vertebrado, tripomastigote sanguíneo (no replicativo, infeccioso) y amastigote (replicativo, no infeccioso). Adaptado de Macedo y col. (2002).

Biología celular

T. cruzi posee características distintivas que son compartidas por otros tripanosomátidos, como por ejemplo la presencia del kinetoplasto, el mitocondrion y el glicosoma. A continuación se describirán algunos aspectos de la biología, organización y estructura celular del parásito:

-La *superficie celular* se compone de la membrana plasmática y el citoesqueleto, caracterizado por la presencia de una capa de microtúbulos subpeliculares que envuelven al parásito. La membrana presenta diferencias morfológicas y de composición que permiten dividirla en al menos tres macrodominios, el cuerpo celular, el flagelo y el bolsillo flagelar. La membrana posee una serie de hidratos de carbono asociados a la misma orientados hacia el medio extracelular que conforman el glicocálix del parásito (De Souza, 2009).

-*Flagelo y bolsillo flagelar.* *T. cruzi* contiene un único flagelo que emerge desde una invaginación de la membrana plasmática llamada bolsillo flagelar. El flagelo está adherido al cuerpo celular en su mayor parte y se encuentra en estrecho contacto con la membrana plasmática. El mismo está formado por un axonema de estructura clásica, acompañado por una segunda estructura larga y filamentosa llamada barra paraflagelar (Bastin *et al.*, 2000). El flagelo de los tripanosomátidos es

considerado una organela multifuncional que cumple varios roles críticos como por ejemplo su participación en la movilidad del parásito, la cual está involucrada tanto en la patogénesis de la enfermedad como en la transmisión. A su vez el flagelo y la movilidad flagelar son importantes en otros procesos como morfogénesis, división celular y evasión del sistema inmune (Ralston & Hill, 2008).

El bolsillo flagelar permite el contacto directo entre la membrana del cuerpo celular y la membrana del flagelo y por esta razón es considerado como un compartimento extracelular especial parcialmente aislado del medio externo. La membrana del bolsillo flagelar es una región altamente especializada, difiere en composición y distribución de proteínas con respecto al resto de las membranas y carece de microtúbulos subpeliculares. Es el único sitio, identificado hasta el momento, donde se llevan a cabo los procesos de endocitosis y exocitosis (Landfear & Ignatushchenko, 2001).

-El *complejo kinetoplasto-mitocondria*. El orden Kinetoplastida se caracteriza por poseer una única mitocondria, altamente ramificada, donde el ADN mitocondrial forma una estructura compacta llamada kinetoplasto (ADNk). Este ADN se compone por minicírculos con un tamaño de 0,5-2,5 kb y maxicírculos de 20-40 kb, en estos últimos están codificados componentes proteicos de la cadena respiratoria y ARNs ribosomales mitocondriales (De Souza, 2002, 2009). Sin embargo, para que ocurra la correcta traducción de los ARNs, estos deben ser previamente editados en un proceso conocido como edición del ARN mitocondrial. A partir de los minicírculos se transcriben los denominados ARNs guías que se hibridan a los transcritos primarios de los maxicírculos y asisten en la eliminación de nucleótidos o la incorporación de uridinas. Estas inserciones/delecciones generan transcritos que podrán ser traducidos dentro de la misma organela (Simpson *et al.*, 2004; Stuart *et al.*, 2005).

-El *glicosoma* es una estructura esférica con una matriz homogénea, rodeada por una única membrana. Esta organela aísla la mayor parte del sistema de enzimas glucolíticas en el citoplasma del parásito, además constituye el lugar donde ocurren las vías del salvataje de purinas, la vía de las pentosas fosfato, de la síntesis de pirimidinas y de la gluconeogénesis, metabolismo de peróxidos, β -oxidación de ácidos grasos, síntesis de éteres fosfolípidos, fijación de carbono, elongación de ácidos grasos, biosíntesis de isoprenoides y biosíntesis de esteroides. El glicosoma no posee un genoma propio, por lo tanto todas las proteínas encontradas en él están codificadas por genes nucleares, traducidos en ribosomas citoplasmáticos e importadas dentro de la organela (De Souza, 2009).

-Los *acidocalcisomas* son estructuras esféricas, rodeadas por una única membrana. Estas organelas ácidas están involucradas en funciones tales como (i) el almacenamiento de calcio,

magnesio, sodio, potasio, zinc, hierro y compuestos de fósforo, especialmente pirofosfato y polifosfato inorgánico, (ii) homeostasis del pH y (iii) osmorregulación, actuando en estrecha asociación con una vacuola contráctil (Docampo *et al.*, 2005).

-La *vacuola contráctil* es una estructura formada por varios túbulos conectados a una vacuola central ubicada cerca del bolsillo flagelar. Se ha descrito la presencia de acuaporinas, proteínas involucradas en el transporte de agua, tanto en los acidocalcisomas como en la vacuola contráctil. Estas estructuras parecen estar involucradas en procesos de osmoregulación (Rohloff & Docampo, 2008).

-Los *reservosomas* son compartimentos grandes y esféricos presentes en la región posterior de la forma epimastigote, encontrados únicamente en miembros del subgénero *Schizotrypanum*, como en *Trypanosoma vespertilionis*, *Trypanosoma dionisii* y *T. cruzi*. En estas organelas se almacenan macromoléculas ingeridas a través del complejo citostoma-citofaringe, por procesos endocíticos, a modo de reserva para su futuro uso. Dicho complejo es una estructura altamente especializada que se encuentra en la superficie del parásito, cerca del bolsillo flagelar y a través del mismo. Los reservosomas también concentran hidrolasas lisosomales y por lo tanto, se consideran el sitio principal de regulación y degradación de proteínas. Además, acumulan grandes cantidades de cruzipaina, la principal enzima proteolítica de *T. cruzi*. Estas estructuras habían sido observadas únicamente en el estadio epimastigote, sin embargo organelas relacionadas fueron encontradas en tripomastigotes y amastigotes (De Souza, 2009).

-El *núcleo* se encuentra rodeado de una membrana nuclear típica provista de poros. Puede observarse continuidad entre la membrana nuclear externa y el retículo endoplásmico. En el centro del núcleo, o ligeramente desfasado, puede encontrarse el nucléolo (De Souza, 2002).

En la figura 6 se detallan en un esquema las estructuras subcelulares de *T. cruzi*.

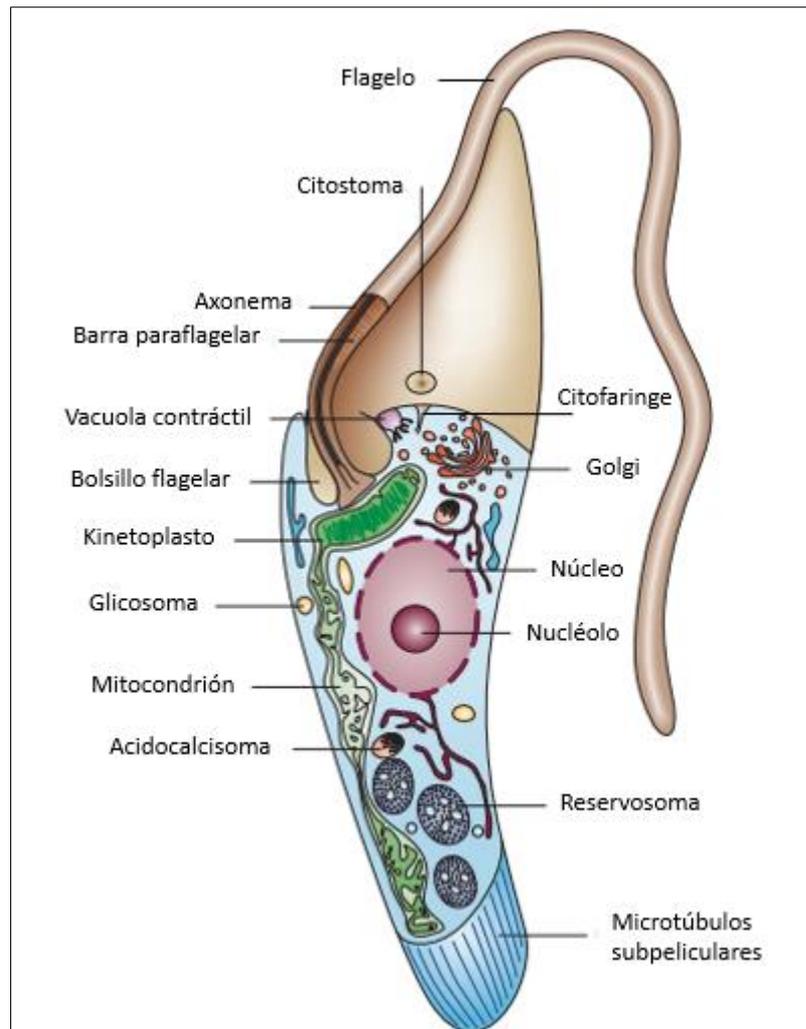


Figura 6. Esquema de un epimastigote de *T. cruzi* en el cual se detallan las estructuras subcelulares. Adaptado de Docampo y col. (2005).

El genoma

La secuencia genómica de *T. cruzi* fue publicada junto con las secuencias genómicas completas de *Leishmania major* y *T. brucei* en 2005 (El-Sayed, Myler, Blandin *et al.*, 2005). Juntos estos tres parásitos se conocen como TriTryps. En el caso particular del *T. cruzi*, el proyecto incluyó un análisis proteómico que abarcó los cuatro estadios del ciclo de vida del parásito, de la cepa CL Brener (un híbrido natural de TcII y TcIII). Se identificaron 22.570 genes que codifican para proteínas y aproximadamente la mitad del genoma está cubierto por secuencias repetitivas. El proyecto también reveló 6.200 proteínas presentes en todos los TriTryps que representan blancos potenciales para drogas de amplio espectro. Sin embargo el 50% de estos genes codifican para proteínas hipotéticas con función desconocida (Clayton, 2010b).

T. cruzi posee un genoma diploide estimado en aproximadamente 60,4 Mb (El-Sayed, Myler, Blandin *et al.*, 2005). Diferentes análisis de densitometría y electroforesis de campo pulsante han

permitido identificar 55 cromosomas en el parásito, aunque existen variaciones entre cepas (Branche *et al.*, 2006).

Regulación de la expresión génica

Los tripansosomátidos presentan una regulación génica particular. Los genes nucleares de estos organismos carecen de promotores típicos para la ARN polimerasa II (Clayton, 2016). La transcripción comienza en unos pocos sitios dentro de los cromosomas, en donde la composición de histonas y la modificación de las mismas es diferente al resto (Siegel *et al.*, 2009). Este proceso en los parásitos es policistrónico, ya que los ARNm son expresados como largas unidades compuestas por genes no relacionados separados entre sí por cortas secuencias denominadas secuencias intergénicas (Siegel *et al.*, 2009). Estas unidades transcripcionales son posteriormente convertidas en monocistrónicas a través de dos eventos acoplados, el *trans-splicing* y la poliadenilación (Figura 7). El primero consiste en el agregado de un miniexón o *spliced leader* (SL), de 39 nucleótidos, en el extremo 5' del pre-ARNm, que contiene hacia su extremo 5' una base modificada 7-metilguanosina trifosfato (CAP). La poliadenilación involucra la adición de una cola de adeninas en el 3' de los transcritos, señal que sirve para su salida del núcleo y su posterior traducción (Michaeli, 2011).

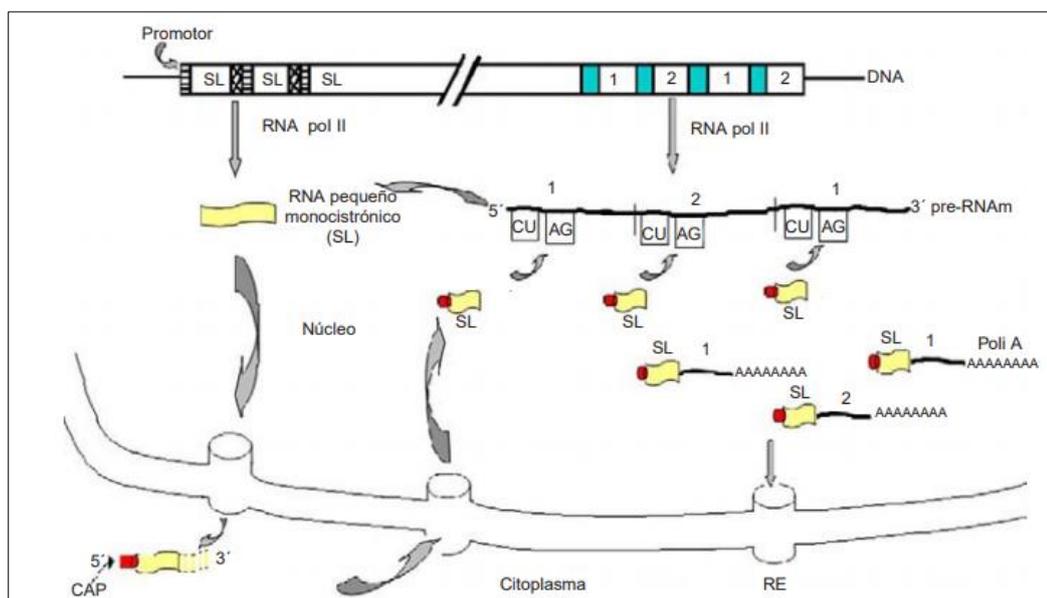


Figura 7. Proceso de maduración del ARNm en *T. cruzi* generado por el mecanismo de *trans-splicing* y la poliadenilación acoplada. El *trans-splicing* fragmenta los ARNm contenidos en los transcritos policistrónicos, y provee la estructura CAP al ARNm a través de la secuencia miniexón (SL). El SL se genera a partir de genes que están regulados por sus propios promotores y localizados en otros loci. El mismo es transportado al citoplasma para adquirir la estructura CAP hacia su extremo 5'. Posteriormente viaja al núcleo e interacciona con el pre-ARNm mediante el reconocimiento de un dinucleótido AG, generando así un ARN maduro que ahora se dirigirá hacia el citoplasma para ser traducido. Adaptado de Gómez Gutiérrez & Monteón Padilla (2008).

La co-transcripción de varios marcos abiertos de lectura resulta en la dependencia de mecanismos post-transcripcionales para la regulación de la expresión génica. En la mayoría de los casos, los elementos regulatorios se encuentran en la región no traducida (UTR, por sus siglas en inglés *UnTranslated Region*) del extremo 3' (Bayer-Santos *et al.*, 2012).

En algunos pocos casos se ha reportado la presencia de intrones y de *cis-splicing* (Mair *et al.*, 2000; Ivens, Peacock *et al.*, 2005), demostrando que ambos procesos co-existen en tripanosomas como ocurre en otros organismos capaces de realizar *trans-splicing*.

T. cruzi posee copias altamente conservadas de las tres ARN polimerasas eucariotas (Pol I, Pol II y Pol III). La ARN Pol III sintetiza todos los ARNs en tripanosomátidos, además de algunos ARNr y ARNt. Los parásitos no poseen ningún gen codificante para proteínas transcritas por la ARN Pol II, sin embargo se ha identificado, asociado al mini-exón, un promotor para la ARN Pol II y se ha propuesto que esta enzima es dirigida a dicha región por mecanismos epigenéticos y no por la presencia de una secuencia específica (Cribb & Serra, 2009).

Como conclusión, debido a la ausencia de promotores, la regulación de la expresión génica no sucede a nivel transcripcional, sino post-transcripcional, traduccional y post-traduccionalmente (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010; Clayton, 2016).

Poliaminas

Características generales

Las poliaminas son moléculas orgánicas de bajo peso molecular, ampliamente distribuidas en todos los seres vivos. A pH fisiológico se encuentran como policationes, presentando una estructura de cargas positivas distribuidas a lo largo de una cadena flexible, lo que les permite interactuar con moléculas cargadas negativamente tales como ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos (Handa *et al.*, 2018).

Las poliaminas más comunes son la putrescina (1,4-diaminobutano), la espermidina (N'-(3-aminopropil)butano-1,4-diamina) y la espermina (N,N'-bis(3-aminopropil)butano-1,4-diamina) (Figura 8). Existen otras poliaminas menos predominantes como la cadaverina, la homoespermidina, noespermidina, homoespermina, noespermina, aminopropil homoespermidina y metil espermidina (Handa *et al.*, 2018). En plantas, principalmente en leguminosas, se han encontrado concentraciones muy altas de cadaverina participando en las rutas metabólicas que conducen a la biosíntesis de alcaloides (Smith, 1975; Gamarnik & Frydman, 1991). Además la termoespermina, un

isómero estructural de la espermina descubierto en plantas, se requiere para el crecimiento de las mismas y demostró ser importante contra el estrés abiótico como el biótico (Takano *et al.*, 2012). En epimastigotes de *T. cruzi* se han detectado cadaverina y aminopropilcadaverina (ver más adelante en esta sección) (Ariyanayagam & Fairlamb, 1997; Ariyanayagam *et al.*, 1998).

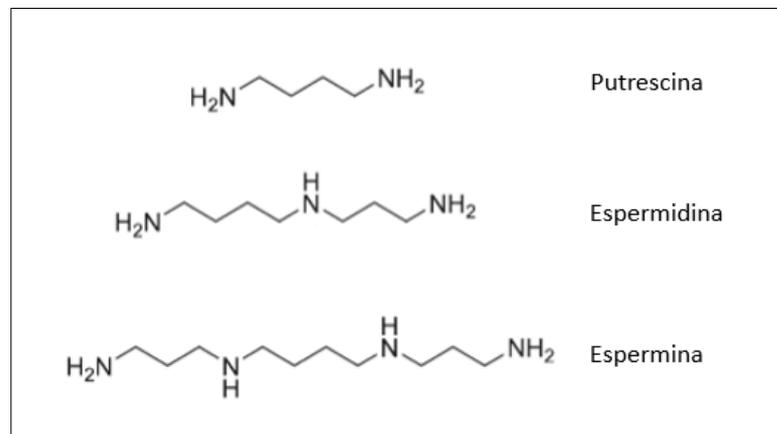


Figura 8. Estructuras químicas de las poliaminas más comunes, putrescina, espermidina y espermina.

Las poliaminas están involucradas en múltiples procesos celulares como la división y diferenciación celular, proliferación celular, homeostasis, transducción de señales y apoptosis (Handa *et al.*, 2018; Bachrach, 2005). Estas moléculas son importantes en la expresión génica debido a su habilidad para unirse a ácidos nucleicos y proteínas, y por tanto, también son capaces de estabilizar y remodelar la estructura de la cromatina. Asimismo, modulan la tasa de transcripción, la unión de proteínas al ADN y son capaces de unirse y producir cambios estructurales en el ARN (Panagiotidis *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1995; Childs *et al.*, 2003; Igarashi & Kashiwagi, 2015).

Las poliaminas han sido asociadas como respuesta y protección frente a todo tipo de estrés tanto en plantas como animales. Las mismas tienen la capacidad de acumular y eliminar especies reactivas de oxígeno e intervenir en la regulación de los sistemas antioxidantes (Ha *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2015).

Estos metabolitos también participan de la regulación de proteínas quinasas cumpliendo un rol regulador sobre la transducción de señales por fosforilación (Bachrach, 2005).

Las poliaminas interactúan con la membrana y la pared celular. Las primeras evidencias incluyeron la estabilización de protoplastos bacterianos y de bacterias con fragilidad osmótica por el agregado de cantidades muy pequeñas de poliaminas, por mecanismos más complejos que una simple estabilización osmótica. Estudios posteriores mostraron que las membranas de las células de mamíferos también son estabilizadas por poliaminas (Schuber, 1989).

Las células en división activa presentan una concentración intracelular de poliaminas y una actividad de las enzimas involucradas en su síntesis notablemente mayor que las células en estado quiescente. Esta observación incluye células neoplásicas y tejidos sanos en continua división como tejidos embrionarios o tejidos en regeneración. Además, se ha observado que la síntesis de poliaminas aumenta antes y durante la síntesis de ADN, lo que indicaría una relación entre la proliferación celular y las poliaminas disponibles (Luk & Casero, 1987; Seiler, 1996).

Además de encontrarse en forma libre, las poliaminas también pueden encontrarse conjugadas con compuestos químicos o estructuras macromoleculares, formando parte de moléculas complejas (Tabor & Tabor, 1976; Bachrach, 2005). Entre los numerosos ejemplos podemos mencionar a un factor de iniciación de la traducción (eIF5A) en eucariotas superiores que presenta una molécula de putrescina unida a un residuo de lisina, dando lugar al aminoácido hipusina (Dever *et al.*, 2014). Tanto la proteína eIF5A como la hipusina son esenciales para el crecimiento y la división celular y para la supervivencia (Bachrach, 2005). Otro ejemplo es el conjugado de glutatión-espermidina denominado tripanotión, característico de los tripanosomátidos, y que está involucrado en el equilibrio redox de los parásitos (ver más adelante en esta sección) (Krauth-Siegel *et al.*, 2003).

Metabolismo de poliaminas en tripanosomátidos

El metabolismo de poliaminas en tripanosomátidos es muy simple y está restringido a unas pocas enzimas comparado con el de células de mamíferos, que es una vía compleja con numerosas enzimas involucradas (Figura 9) (Müller *et al.*, 2001; Pegg & Casero Jr., 2011). La síntesis de poliaminas en *T. brucei* y *Leishmania spp.* se inicia con la descarboxilación de L-ornitina para producir putrescina por acción de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC). En la mayoría de las células eucariotas ésta es la única ruta de síntesis de putrescina, siendo la ODC una enzima clave en el metabolismo de poliaminas y constituyendo uno de los pasos limitantes en su biosíntesis (Willert & Phillips, 2012). En contraste, en bacterias y plantas existe una ruta alternativa para la síntesis de putrescina, que involucra la descarboxilación de L-arginina por acción de arginina descarboxilasa (ADC) (Handa *et al.*, 2018). Particularmente *T. cruzi* no puede sintetizar *de novo* las poliaminas, es decir que es auxótrofo para las mismas, debido a la ausencia de los genes de ODC y de ADC en su genoma; por lo tanto para obtener estos metabolitos el parásito es completamente dependiente del transporte de putrescina desde el medio extracelular (Ariyanayagam & Fairlamb, 1997; Carrillo *et al.*, 1999, 2003). Sin embargo, al igual que otros tripanosomátidos y células de mamíferos, puede sintetizar espermidina a partir de putrescina. Como se muestra en la Figura 9 la espermidina se forma por la adición de un

grupo aminopropilo a la putrescina, catalizado por la espermidina sintasa. El compuesto S-adenosilmetionina decarboxilada (AdoMetdc), proveniente de la decarboxilación de la S-adenosilmetionina (AdoMet), es el dador de grupos aminopropilo para la síntesis de espermidina. Esta reacción es catalizada por la S-adenosilmetionina decarboxilasa (AdoMetDC), otra de las enzimas claves en este metabolismo. La metiltiodenosina (MTA) es un subproducto de la biosíntesis de poliaminas que se recicla a metionina y, por lo tanto, a AdoMet a través de una vía multi-enzimática (MR) (Müller *et al.*, 2001; Pegg, 2013, 2016). Tanto en *T. cruzi* como en *T. brucei* se demostró que la enzima AdoMetDC se activa por la subunidad prozima, un homólogo catalíticamente inactivo de la enzima, y este heterodímero se activa a su vez por putrescina, siendo un mecanismo común requerido para regular la actividad de la AdoMetDC en los tripanosomátidos (Willert & Phillips, 2009).

Hunter *et al.* (1994) postularon que *T. cruzi*, a diferencia de otros tripanosomátidos, podría producir espermina, aunque todavía no se ha identificado la enzima involucrada en dicha reacción. Se ha sugerido que la espermidina sintasa del parásito pudiera ser algo promiscua y capaz de convertir espermidina en espermina. Además, en su genoma no se encontró un homólogo de espermina sintasa, pero pareciera tener dos parálogos de espermidina sintasa (Hunter *et al.*, 1994; Hasne *et al.*, 2016).

Las células de mamíferos pueden sintetizar espermina mediante la acción de la enzima espermina sintasa. Las reacciones que catalizan la síntesis de espermidina y espermina son irreversibles; sin embargo, pueden ser retroconvertidas a putrescina y espermidina, respectivamente por acción combinada de dos enzimas, la espermidina/espermina-N'-acetiltransferasa (SATc) y la poliamina oxidasa (PAO) (Figura 9). Esta vía de interconversión está regulada por diferentes sistemas de transporte o por excreción (Müller *et al.*, 2001; Pegg, 2016). También se ha descrito en mamíferos que la espermina se puede oxidar directamente a espermidina por la enzima espermina oxidasa (Stewart *et al.*, 2018).

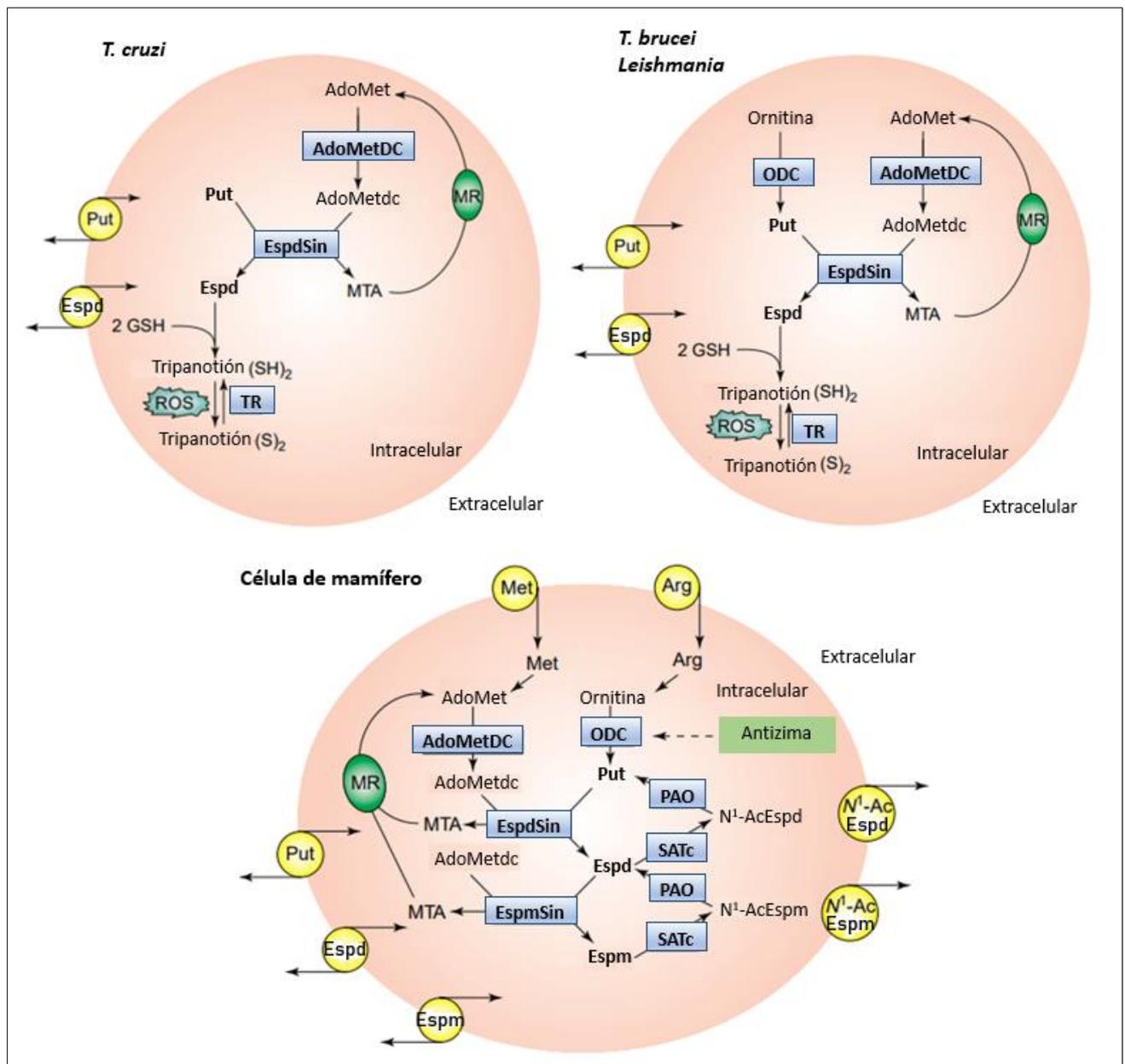


Figura 9. Metabolismo de poliaminas en *T. cruzi*, en *T. brucei* y *Leishmania* spp. (esquemas superiores) y en células de mamíferos (esquema inferior). Abreviaciones: Put, putrescina; Espd, espermidina; Espm, espermina; Met, metionina; Arg, arginina; GSH, glutatión; ROS, especies reactivas de oxígeno; TR, tripanotión reductasa; AdoMet, S-adenosilmetionina; AdoMetDC, S-adenosilmetionina decarboxilasa; AdoMetdc, S-adenosilmetionina decarboxilada; ODC, ornitina decarboxilasa; MTA, metiltioadenosina; MR, vía de reciclado de metionina; PAO, poliamina oxidasa; SATc, N¹-acetiltransferasa citosólica específica para espermidina y espermina; EspdSin, espermidina sintasa; EspmSin, espermina sintasa; N¹-AcEspd, N¹-acetil espermidina; N¹-AcEspm, N¹-acetil espermina. Adaptado de Muller y col. (2001).

Se ha reportado la actividad tripanocida de varios inhibidores que se dirigen a componentes del metabolismo de poliaminas. Un ejemplo es el DFMO, una de las drogas disponibles para tratar la tripanosomiasis Africana, que inhibe la actividad de la ODC. La toxicidad de la droga se basa en la diferencia de la estabilidad de la ODC del parásito (vida media aproximadamente 18 horas) y la del hospedador mamífero (vida media aproximadamente 20 minutos). Cuando el DFMO se une

covalentemente a la enzima de los mamíferos, el complejo se degrada rápidamente y se reemplaza con ODC sintetizada *de novo*. En contraste, el complejo DFMO-ODC dentro del parásito perdura más tiempo y la ODC inactiva se reemplaza lentamente. Por lo tanto, el nivel de proteína activa disminuye y también la formación de putrescina. Eventualmente, el parásito deja de crecer y las células son eliminadas por el sistema inmune del hospedador (Müller *et al.*, 2001).

Una de las funciones más importantes de la espermidina en los tripanosomátidos es formar el tripanotión [N¹, N³-bis (glutationil) espermidina, (T[SH]₂)], uno de sus principales tioles libres. En estos organismos, la espermidina es conjugada con glutatión (GSH) para formar glutationilespermidina y luego, la tripanotión sintetasa (TriS) cataliza la adición de una segunda molécula de glutatión para formar tripanotión. La enzima tripanotión reductasa (TriR) es una flavoproteína responsable de mantener el tripanotión en su estado reducido. Esta molécula sustituye a glutatión en el mantenimiento de tioles reducidos y en el equilibrio de óxido-reducción de estos parásitos. El tripanotión junto con las proteínas TriR y triparedoxina-peroxidasa (TXNPx) conforman el sistema de tripanotión-peroxidasa, fundamental en la defensa contra el daño oxidativo en los tripanosomátidos (Figura 10) (Krauth-Siegel *et al.*, 2003).

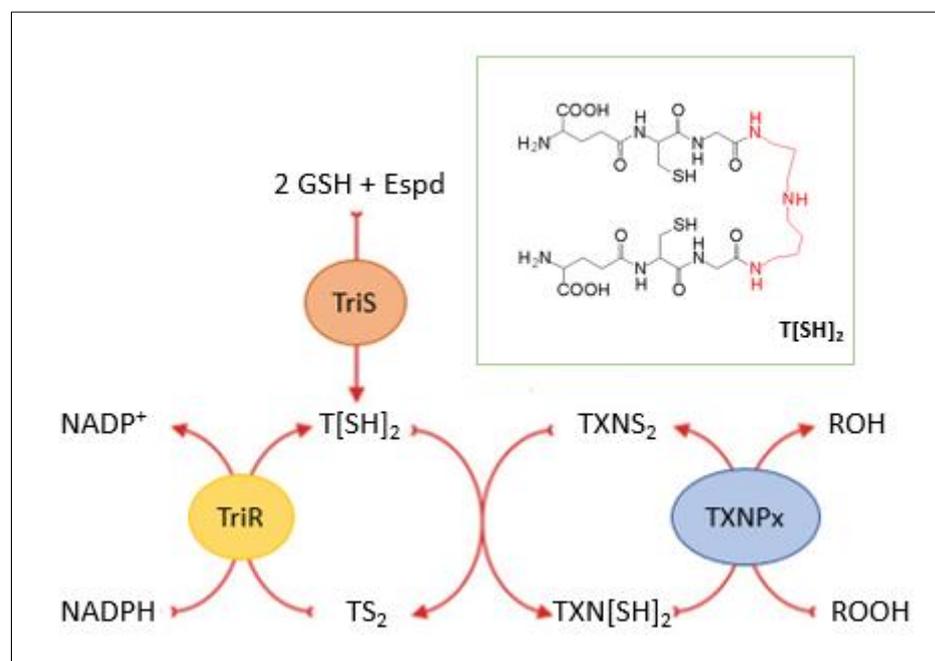


Figura 10. Rol central del tripanotión en la detoxificación de hidroperóxidos. Los hidroperóxidos (ROOH) producidos por los mecanismos de defensa del hospedador se detoxifican en los tripanosomátidos a sus respectivos alcoholes (ROH) por peroxidasa dependientes de la triparedoxina (TXNPx). Los equivalentes reductores para la reacción derivan de NADPH a través de una cadena redox tiol compuesta por tripanotión reductasa (TriR), tripanotión [T[SH]₂, (dihidrotriplanotión/triplanotionina reducida) /TS₂, disulfuro de tripanotión/triplanotión oxidado]] y triparedoxina

(TXNS₂/TXN[SH]₂), [SH]₂ y S₂ se refieren a las formas ditiol (reducido) y disulfuro (oxidado), respectivamente. T[SH]₂ se sintetiza mediante una conjugación paso a paso de dos moléculas de glutatión (GSH) a una molécula de espermidina (Espd, resaltada en rojo en el recuadro), catalizada por tripanotión sintetasa (TriS). Adaptado de Birkholtz y col. (2011).

En epimastigotes de *T. cruzi* se demostró que la cadaverina es incorporada por el parásito y convertida en los análogos de poliaminas aminopropilcadaverina, bis (aminopropil) cadaverina y en un conjugado de poliamina-tiol identificado como N¹, N⁹-bis (glutationil) aminopropilcadaverina (homotripanotión). Las propiedades cinéticas de la TriR de *T. cruzi* indicarían que el homotripanotión es un sustrato fisiológico de dicha enzima; este compuesto sería un mediador importante en la respuesta celular al estrés oxidativo (Hunter *et al.*, 1994). La forma epimastigote de *T. cruzi* reside en el intestino del vector triatomino en donde se encuentran bacterias que secretan cadaverina. Las mismas serían la fuente de dicha poliamina encontrada en el insecto y por lo tanto, a diferencia de otros tripanosomátidos, el parásito podría haberse adaptado para metabolizarla (Hunter *et al.*, 1994).

La ausencia de esta vía en mamíferos y la sensibilidad de los tripanosomátidos al estrés oxidativo, por ejemplo por la ausencia de catalasa, hacen que las enzimas del metabolismo del tripanotión sean interesantes blancos para el desarrollo de nuevas drogas contra la enfermedad de Chagas, la tripanosomiasis Africana y las diferentes formas de leishmaniasis (Krauth-Siegel *et al.*, 2003).

Transporte de metabolitos

Generalidades

Los sistemas de transporte son esenciales en las células ya que permiten la entrada de iones y nutrientes, regulan las concentraciones citoplasmáticas de metabolitos por mecanismos de excreción, previenen los efectos tóxicos de drogas y toxinas mediante el flujo activo, exportan macromoléculas e intervienen en la comunicación de las células entre sí y con el medio (Busch y Saier, 2002). En su mayoría, los procesos de transporte son mediados por proteínas integrales de membrana, muchas de las cuales funcionan en conjunto con receptores extracitoplasmáticos así como también con proteínas regulatorias (Reizer & Jrt, 1997; Higgins, 1995; Tomii & Kanehisa, 1998; Saurin *et al.*, 1999). Cada complejo de estas proteínas o dominios de proteínas es referido como un sistema de transporte, que cataliza una reacción vectorial, independientemente de la catálisis de una reacción química o de una reacción de transferencia de electrones que impulsa el proceso vectorial (Saier, 2000).

El transporte de solutos orgánicos como azúcares, aminoácidos, péptidos, neurotransmisores y drogas a través de la membrana plasmática es llevado a cabo por transportadores activos y pasivos (Figura 11).

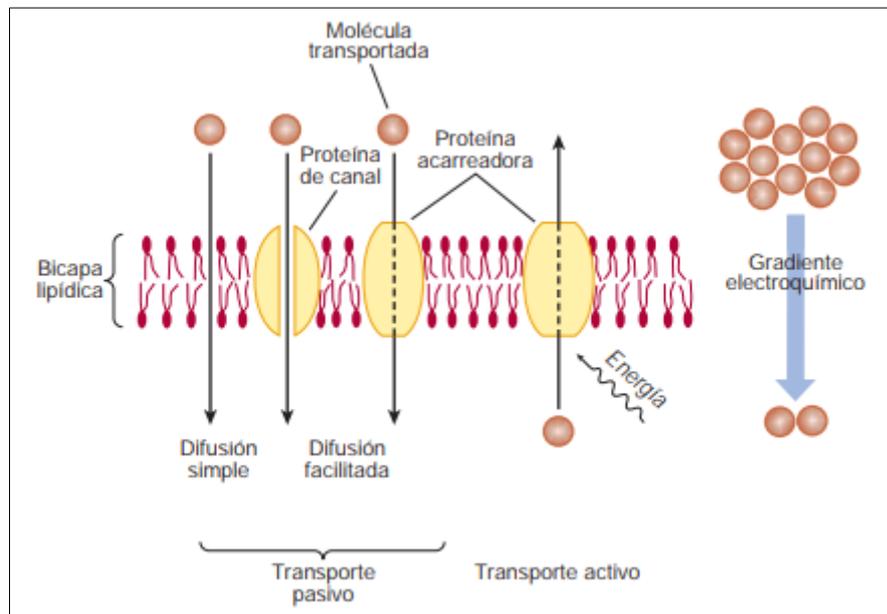


Figura 11. Transportadores de membrana. Adaptado de Harper Bioquímica ilustrada, 28ª edición.

Los *transportadores activos* transportan con consumo de energía ciertos solutos a través de la membrana contra sus gradientes de concentraciones. Este tipo de transporte es direccional porque está acoplado a una fuente de energía metabólica como la hidrólisis de ATP o a un gradiente de iones (Hediger, 1994). Estos sistemas se pueden clasificar además por la dirección del flujo de los sustratos transportados: (i) cuando existe un co-transporte de dos componentes en el mismo sentido se denomina simportador, (ii) los sistemas denominados antiportadores transportan dos componentes en sentidos opuestos, y (iii) los uniportadores catalizan el transporte de una única molécula independientemente del movimiento de otro soluto (Saier, 2000).

El *transporte pasivo* incluye el transporte facilitado y los canales que permiten la difusión de solutos a través de las membranas a favor de un gradiente de concentración, por lo que no interviene ninguna fuente de energía externa (Hediger, 1994). Las proteínas canal forman poros abiertos a través de la membrana y permiten la difusión de cualquier molécula del tamaño y carga apropiados. En el transporte facilitado, el tránsito de solutos es mediado por proteínas que suelen exhibir tasas de transporte de varios órdenes de magnitud inferiores a las de los canales (Saier, 2000).

Por otro lado, los sustratos de los sistemas de transporte han sido clasificados en función de la importancia biológica en ocho categorías: (i) solutos inorgánicos; (ii) carbohidratos; (iii) aminoácidos

y derivados; (iv) bases y derivados; (v) vitaminas, cofactores, moléculas de señalización y sus precursores; (vi) drogas, colorantes, esteroides y sustancias tóxicas; (vii) macromoléculas; y (viii) diversos compuestos (Saier, 2000).

Transportadores en tripanosomátidos

Se han creado bases de datos para proveer a la comunidad científica de un fácil acceso a la extensa información sobre transportadores; esto incluye a la base de datos *Transporter Classification Database* (TCDB, <http://www.tcdb.org>) que clasifica a los transportadores basándose en criterios funcionales, genómicos, estructurales y filogenéticos. En la misma, se definen más de 1.000 familias de proteínas de transporte (Saier *et al.*, 2016). La superfamilia *Amino Acid-Polyamine-Organocation* (APC) consiste en numerosas familias de transportadores de aminoácidos y sus derivados. Una de ellas, la familia *Amino Acid/Auxin Permease* (AAAP) pertenece a la clase de transportadores impulsados por potenciales electroquímicos, e incluye cientos de proteínas de plantas, animales, levaduras y otros hongos. Estas proteínas poseen una amplia especificidad de sustrato pudiendo hasta transportar los veinte aminoácidos, incluyendo los isómeros D (Young *et al.*, 1999; Reizer *et al.*, 1994).

Utilizando datos preliminares del genoma no ensamblado de *T. cruzi*, se realizaron análisis bioinformáticos buscando posibles genes codificantes para transportadores de aminoácidos en el parásito. De este modo se identificó a la familia AAAP como la más representada en el genoma del mismo, abarcando permeasas con características de simportadores H⁺/aminoácido. Dentro de la familia AAAP del parásito se identificaron inicialmente al menos 60 miembros distribuidos en 12 grupos principales, con identidad de secuencia de más del 70% dentro de cada grupo. Interesantemente, las proteínas de esta familia son diferentes de las proteínas transportadoras de mamíferos, ya que se observó hasta un 26% de identidad entre los transportadores del parásito y de los mamíferos (Bouvier *et al.*, 2004). Dicha caracterización bioinformática fue refinada con la publicación de los genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*, quedando al menos 36 posibles permeasas de aminoácidos diferentes. Mediante un análisis exhaustivo se demostró que esta familia de transportadores se encuentra en los tres tripanosomátidos (Jackson, 2007).

A continuación se revisarán algunos de los sistemas de transporte de metabolitos y sus correspondientes proteínas en los tripanosomátidos *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania* spp.

Los aminoácidos participan en una amplia variedad de rutas metabólicas que conducen a muchos compuestos esenciales para la supervivencia de los tripanosomátidos. La incorporación de estos metabolitos en los parásitos puede ser considerado como el primer paso de numerosas vías metabólicas. En *T. cruzi*, *T. brucei* y diferentes especies de *Leishmania* se han descrito varios transportadores de aminoácidos con un amplio rango de afinidades y especificidades, señalando la importancia de estos nutrientes para los parásitos, disponibles en los diferentes ambientes.

Nuestro grupo caracterizó un sistema de transporte de arginina de alta afinidad y especificidad, dependiente de ATP en epimastigotes de *T. cruzi*. También se mostró que no es sensible al cambio de pH, a diferencia de la mayoría de los transportadores de aminoácidos de las células de mamíferos (Pereira *et al.*, 1999). Posteriormente se describió un sistema de transporte de baja afinidad para arginina mediado por H⁺, que sería complementario al previamente descrito como parte de un mecanismo de adaptación a las distintas concentraciones de este aminoácido en los hospedadores mamíferos e insectos (Canepa *et al.*, 2004). La arginina puede ser utilizada como un reservorio de energía en su forma fosforilada como fosfoarginina, en donde acumula un fosfato de alta energía que puede transferir rápidamente al ADP para generar ATP en situaciones de alto consumo energético celular. Este sistema es particularmente relevante ya que los tripanosomátidos carecen de sustancias de reserva en forma de hidratos de carbono, y esta ruta metabólica se encuentra completamente ausente en mamíferos (Pereira *et al.*, 2000). Se identificó un transportador de arginina denominado TcAAP3 con una elevada especificidad por su sustrato. El mismo está involucrado en la regulación del metabolismo de dicho aminoácido y en el balance energético celular; y es al menos uno de los componentes del sistema de transporte de arginina de alta afinidad de *T. cruzi* mencionado anteriormente (Carrillo *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2012). En *L. donovani* y en *T. brucei* también se identificaron dos transportadores de alta especificidad y afinidad por arginina denominados LdAAP3 y TbAAT5-3, respectivamente (Shaked-Mishan *et al.*, 2006; Mathieu *et al.*, 2017). Por otro lado, se caracterizó un transportador intracelular de alta afinidad para arginina y de baja afinidad para ornitina llamado TcCAT1.1, que participa en la homeostasis de la arginina a lo largo del ciclo de vida del *T. cruzi* (Henriques *et al.*, 2015).

Respecto al transporte de lisina se han caracterizado permeasas de alta afinidad para el sustrato en *T. cruzi*, *L. donovani* y *T. brucei* llamadas TcAAP7, LdAAP7 y TbAAT16-1, respectivamente (Inbar *et al.*, 2012; Mathieu *et al.*, 2017). Al igual que los transportadores de arginina, estas permeasas presentan una elevada especificidad por su sustrato y sugieren que en la familia AAAP de dichos parásitos predominan los transportadores mono-específicos. Estas especificidades de sustratos

representan una importante diferencia con respecto al hospedador mamífero, cuyas permeasas co-transportan lisina y arginina, ya que poseen transportadores generales de aminoácidos catiónicos (Mathieu *et al.*, 2017; Verrey *et al.*, 2004).

Cabe señalar que los tripanosomátidos son auxótrofos para varios aminoácidos, entre ellos arginina y lisina, por lo que su disponibilidad dentro de la célula depende de procesos de transporte (Chaudhary & Roos, 2005; Marchese *et al.*, 2018). De hecho, Mathieu *et al.* (2017) demostraron que las permeasas TbAAT5-3 y TbAAT16-1 son esenciales para la supervivencia de *T. brucei*.

En *T. cruzi* se ha identificado un sistema de transporte de alta afinidad para aspartato, cuya actividad es sensible al pH extracelular (Canepa *et al.*, 2005). Posteriormente se caracterizó el transporte de glutamato con características bioquímicas muy similares al reportado en el sistema de aspartato (Silber *et al.*, 2006), sugiriendo que ambos aminoácidos pueden ingresar por el mismo sistema de transporte.

La prolina constituye una de las principales fuentes de carbono para la mayoría de los tripanosomátidos. También es necesaria durante la invasión celular de tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* y para progresar en su ciclo de vida dentro de las células de mamíferos (Martins *et al.*, 2009; Tonelli *et al.*, 2004). Se caracterizaron dos sistemas de transporte para prolina en el parásito, el sistema A de alta afinidad, y el sistema B de baja afinidad. Ambos transportes son activos e independientes de cationes de sodio o potasio, pero uno utiliza ATP como fuerza impulsora (sistema B), mientras que el otro utiliza un gradiente de H^+ a través de la membrana plasmática (sistema A) (Silber *et al.*, 2002). Considerando que el ciclo de vida del parásito se desarrolla en ambientes muy diferentes en cuanto a pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes, no sorprende encontrar más de un sistema de transporte con diferentes propiedades bioquímicas, y por lo tanto teniendo la capacidad de funcionar en diferentes contextos. Posteriormente nuestro laboratorio caracterizó un transportador de prolina denominado TcAAAP0069 mono-específico para D- y L-prolina que está involucrado en mecanismos de resistencia a drogas tripanocidas y a especies reactivas de oxígeno (Saye *et al.*, 2014). También se caracterizó su ortólogo en *T. brucei*, denominado TbAAT6. El mismo es un transportador de baja afinidad y poco selectivo para aminoácidos neutros, entre ellos prolina (Mathieu *et al.*, 2014). En *L. donovani* se describieron tres sistemas de transporte de prolina que son estadio-específico, y al igual que los sistemas de *T. cruzi*, están regulados por el pH (Mazareb *et al.*, 1999). El transportador de baja afinidad para prolina que también transporta alanina, LdAAP24, es responsable de uno de estos sistemas descriptos. El mismo es esencial para la regulación del volumen

celular durante el estrés osmótico y regula el transporte y la homeostasis de glutamato y arginina (Inbar *et al.*, 2013).

Además, se demostró que los transportadores de aminoácidos también intervienen en el transporte de drogas. Por ejemplo, el transportador TbAAT6 fue identificado como la puerta de entrada para eflornitina (DFMO, difluorometilornitina), la principal droga usada para la tripanosomiasis Africana (Mathieu *et al.*, 2014). Recientemente se caracterizaron dos transportadores de alta afinidad para ornitina en el mismo parásito denominados TbAAT10-1 y TbAAT2-4, que representan los principales sistemas de transporte para los precursores de poliaminas, y se demostró que modulan la sensibilidad a las drogas eflornitina y suramina utilizadas también contra la tripanosomiasis Africana (Macedo *et al.*, 2017).

También se han descrito las actividades bioquímicas correspondientes a los sistemas de transporte específicos para cisteína, histidina, treonina, metionina, serina, aminoácidos de cadena ramificada y ácido gamma-aminobutírico, con diferentes afinidades. La gran mayoría de estos sistemas son sensibles al pH, como casi todos los transportadores de aminoácidos caracterizados hasta el momento; sin embargo, no se han podido identificar las proteínas responsables de dichos procesos de transporte (Marchese *et al.*, 2018).

En la Tabla 2 se resumen algunos de los transportadores y sistemas de transportes caracterizados en *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania* spp., mencionados anteriormente.

Aminoácido	<i>T. cruzi</i>	<i>T. brucei</i>	<i>Leishmania</i> spp.	Nombre del transportador
Arginina	Dos sistemas		Un sistema	TcAAP3/ TcCAT1.1 TbAAT5-3 LdAAP3 y LaAAP3
Lisina	Un sistema		Un sistema	TcAAP7 TbAAT16-1 LdAAP7
Aspartato	Un sistema			
Glutamato	Un sistema		Un sistema	
Prolina	Dos sistemas	Dos sistemas	Tres sistemas	TcAAAP0069 TbAAT6 LdAAP24
Ornitina				TcCAT1.1 TbAAT10-1/ TbAAT2-4

Tabla 2. Transportadores y sistemas de transporte de aminoácidos que han sido identificados y caracterizados en los tripanosomátidos.

Otros sistemas de transporte y sus correspondientes proteínas han sido estudiados en los tripanosomátidos. Por ejemplo, fueron descritos dos vías distintas de transporte de nucleótidos, uno de turbecidina (análogo de adenina) y timidina; y otro de inosina y adenosina, en *T. cruzi*. A diferencia de su hospedador mamífero, el parásito no sintetiza purinas *de novo* por lo que su disponibilidad intracelular depende de estos procesos de transporte y, en menor medida, de vías de salvataje (Finley *et al.*, 1988). En *T. brucei*, se describió un transportador de adenosina y adenina llamado P2, el cual, además, resultó ser una vía de ingreso de las drogas pentamidina y melarsoprol, utilizadas en el tratamiento contra este parásito (Carter & Fairlamb, 1993; Baliani *et al.*, 2005).

Por otro lado, los tripanosomátidos son auxótrofos para hemo y por lo tanto, deben incorporarlo desde el medio extracelular para unirse en las proteínas que lo requieran, así como también utilizarlo como fuente de hierro. Se han descrito proteínas en especies de *Leishmania*, *T. brucei* y *T. cruzi*, cuya función estaría relacionada con el transporte y/o el metabolismo de hemo (Lara *et al.*, 2007; Taylor & Kelly, 2010; Cupello *et al.*, 2011; Huynh *et al.*, 2012; Merli *et al.*, 2016).

La riboflavina es una vitamina esencial para toda célula, por ser precursora de los cofactores flavín mononucleótido y flavín adenín dinucleótido, responsables de una gran variedad de reacciones celulares. Se ha demostrado que los tripanosomátidos son auxótrofos para dicha vitamina. Recientemente, en estos parásitos se identificó y caracterizó una familia de transportadores de riboflavina denominada RibJ, que presenta diferencias estructurales y bioquímicas con los transportadores humanos (Balcazar *et al.*, 2017).

En los tripanosomátidos, el transporte de glucosa, una fuente crucial de energía, se puede considerar como el primer paso regulado de la glucólisis. Por el momento se ha descrito un único sistema de transporte de hexosas en *T. cruzi*, presente tanto en epimastigotes como en tripomastigotes. Se trata de un sistema de difusión facilitada, con alta afinidad por la glucosa, que también reconoce D-fructosa y está relacionado con los que se han encontrado en *Leishmania spp.*, *T. brucei*, *T. vivax* y *Crithidia fasciculata*. Los transportadores de hexosas demostraron ser esenciales para la viabilidad de estos parásitos (Tetaud *et al.*, 1997, 2000; Barrett *et al.*, 1998; Pereira & Silber, 2012).

Debido a la importancia de los metabolitos en la supervivencia de los tripanosomátidos, y considerando que son auxótrofos para muchas de estas moléculas y varios de sus transportadores son diferentes de las permesas del hospedador mamífero, la incorporación de estos nutrientes es considerado un blanco para el diseño de nuevas drogas tripanocidas.

Transporte de poliaminas

Como ya se mencionó, las poliaminas cumplen funciones celulares esenciales tales como asistir la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, estabilizar macromoléculas y estructuras celulares y participar en la proliferación y diferenciación celular (Pegg & Casero Jr., 2011). En contraste con otros tripanosomátidos, *T. cruzi* es incapaz de sintetizar poliaminas *de novo*, por lo que su disponibilidad intracelular depende exclusivamente de procesos de transporte (Carrillo *et al.*, 1999, 2003) y, por ende, es un mecanismo fundamental para su supervivencia.

El estudio del transporte de poliaminas en *T. cruzi* es interesante desde dos aspectos: (i) el posible diseño de un inhibidor dirigido contra el transportador que impida la incorporación de las poliaminas; o (ii) el diseño de drogas asociadas a poliaminas que puedan ser internalizadas por este sistema de transporte y actuar específicamente dentro del parásito (Müller *et al.*, 2001).

En epimastigotes de *T. cruzi* fueron descritos bioquímicamente dos sistemas de transporte con alta afinidad para putrescina y cadaverina y de baja afinidad para espermina y espermidina. Estos sistemas son regulados por las condiciones de crecimiento. El transporte de putrescina es dependiente de la temperatura y requiere de la presencia de un potencial de membrana y de grupos tiones, y su actividad se altera en respuesta a los niveles de putrescina extracelular (Le Quesne & Fairlamb, 1996).

El primer transportador de poliaminas de superficie celular de células eucariotas fue identificado en *L. major* denominado LmPOT1, y se demostró que es una permeasa de alta afinidad para putrescina y espermidina. El transporte es sensible a la inhibición por pentamidina, una droga utilizada en el tratamiento de la leishmaniasis y la tripanosomiasis Africana, y por ionóforos de protones, sugiriendo que LmPOT1 puede ser un simportador de protones (Basselin *et al.*, 1996; Hasne & Ullman, 2005). En contraste, en *T. brucei* todavía no se identificó ningún sistema de transporte de poliaminas (Ariyanayagam *et al.*, 1998). Sin embargo, una mutante del parásito auxótrofa para estas moléculas recuperó su capacidad proliferativa cuando se cultivó en presencia de putrescina, indicando que el transporte se vuelve imprescindible cuando la síntesis de poliaminas está inhibida (Li *et al.*, 1996). Además, *T. brucei* es sensible al tratamiento con el inhibidor de la síntesis de poliaminas DFMO, en condiciones de muy baja disponibilidad de putrescina y espermidina como el torrente sanguíneo de su hospedador mamífero (menor a 1 μ M), por lo que el transporte no puede cubrir los requerimientos básicos para su supervivencia (Phillips, 2018). Todas estas observaciones sugieren que *T. brucei* puede transportar poliaminas del medio extracelular eficientemente.

Tampoco se han identificado transportadores de poliaminas en los hospedadores mamíferos de estos parásitos (Belting *et al.*, 2003; Soulet *et al.*, 2004).

Nuestro laboratorio ha caracterizado funcionalmente el gen de *T. cruzi* ortólogo al transportador de *L. major* LmPOT1. Este gen, denominado *tcpat12*, se expresó en ovocitos de *Xenopus laevis* y demostró ser un transportador con alta afinidad para espermidina, el cual también mostró una actividad de transporte para putrescina y L-arginina (Carrillo *et al.*, 2006). A diferencia de los tripanosomátidos, en bacterias se han identificado diversas permeasas de poliaminas con distintas complejidades, entre ellos sistemas de transporte compuestos por varias proteínas y otros formados por una única proteína como el PotE, el cual se encontró en *T. cruzi* y *L. major*. Cabe destacar que las estructuras de las permeasas LmPOT1 y TcPAT12 comparten con la del PotE 12 posibles dominios transmembrana, y además una similitud en su secuencia aminoacídica incluyendo dos residuos críticos para el reconocimiento de las poliaminas (Soksawatmaekhin *et al.*, 2004; Hasne & Ullman, 2005; Carrillo *et al.*, 2006; Hasne *et al.*, 2010).

En la figura 12 se esquematizan los sistemas de transporte de poliaminas caracterizados en estos tripanosomátidos.

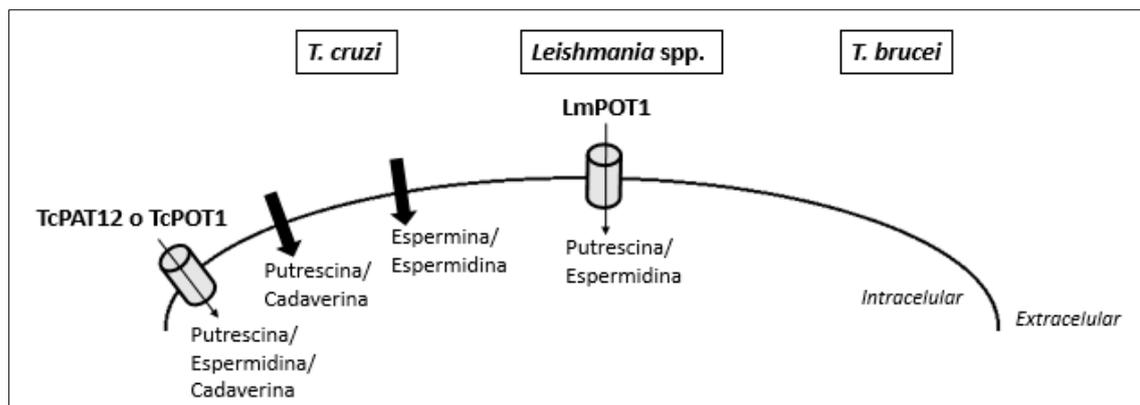


Figura 12. Transportadores (cilindros) y sistemas de transporte (flechas) de poliaminas que han sido identificados y caracterizados en *T. cruzi* y *Leishmania* spp. En *T. brucei* todavía no se identificó ningún sistema de transporte de poliaminas.

Posteriormente se profundizó la caracterización de TcPAT12 como un transportador de putrescina-cadaverina, bajo la denominación de TcPOT1. Se reportó que la función y localización de este transportador pueden regularse por el contenido de poliaminas del medio extracelular (Hasne *et al.*, 2010). Adicionalmente, se demostró mediante *knock-out* del *tcpot1* que la pérdida de dicho gen afecta la capacidad del parásito para mantener una infección en las células de mamífero, y se postuló que existe un mecanismo de transporte secundario de baja afinidad para las poliaminas que

si bien es operativo y permite la supervivencia de *T. cruzi*, resulta insuficiente para una infección óptima (Hasne *et al.*, 2016).

II-Hipótesis y objetivos

Es por todo lo antes expuesto que como **hipótesis central** de esta tesis se plantea que la inhibición del transporte de poliaminas, y por lo tanto la disminución de su disponibilidad intracelular, afecta la viabilidad de *T. cruzi*.

El **objetivo general** de este trabajo es profundizar el estudio de los transportadores de poliaminas de *T. cruzi*, y evaluarlos como posibles blancos terapéuticos contra la enfermedad de Chagas.

Los **objetivos específicos** se detallan a continuación:

- Continuar con la caracterización del transportador de poliaminas TcPAT12, mediante la generación de parásitos transgénicos de *T. cruzi* que sobre-expresen dicha proteína, y estudiar su participación en la regulación de procesos tales como la resistencia a estrés y a drogas tripanocidas.
- Identificar mediante estudios bioinformáticos otros posibles transportadores de poliaminas en el genoma del parásito.
- Estudiar el efecto de la pentamidina sobre el transporte de poliaminas, y analizar la relación entre la permeasa TcPAT12 y la acción de la droga utilizando el modelo de parásitos transgénicos.
- Realizar una búsqueda de inhibidores del transportador de poliaminas entre drogas aprobadas para su uso en humanos, mediante el empleo de la técnica de rastreo virtual o *virtual screening*, y luego validar de manera experimental las predicciones del modelo computacional. Evaluar la actividad tripanocida de los inhibidores.
- Estudiar *in vitro* diferentes análogos sintéticos de poliaminas como posibles inhibidores del transporte de dichas moléculas y analizarlos como agentes antichagásicos.

III-Materiales y métodos

Soluciones

PBS: 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl; 2 mM KH_2PO_4 ; 10 mM Na_2HPO_4 .

Solución PI: Tris-HCl (pH 8) 25 mM; EDTA (pH 8) 10 mM; glucosa 50 mM.

Solución PII: NaOH 0,2 N; SDS 1% (p/v).

Solución PIII: Acetato de potasio (pH 4,8) 3 M.

Buffer TAE 50X: (1 litro) Tris base 242 g; ácido acético glacial 57,1 ml; EDTA 0,5 M (pH8) 100 ml.

Buffer de siembra para muestras de ADN (Loading Buffer) 6X: azul de bromofenol 0,25% (p/v); xileno cianol 0,25% (p/v); glicerol 30% (v/v).

Buffer Taq: KCl 5 mM; Tris-HCl (pH 9) 10 mM; triton X-100 0,1%.

Buffer TE: Tris-HCl 10 mM (pH 8); EDTA (pH 8) 1 mM.

Buffer TE/AcLi: TE; acetato de litio 100 mM.

Buffer TE/AcLi/PEG₄₀₀₀: TE; acetato de litio 100 mM; PEG₄₀₀₀ 40%.

PIC: Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, 25:24:1 equilibrado con buffer Tris.

Buffer de siembra para muestras de proteínas (Cracking Buffer) 5X: glicerol 50% (v/v); DTT 7,7% (p/v); SDS 10% (p/v); Tris-HCl 0,4 M pH 6,8; azul de bromofenol 0,002% (p/v).

Solución de Rojo Ponceau: 0,2% (p/v) Rojo Ponceau; 0,5% (v/v) ácido acético. Llevar a volumen con agua.

Buffer de electroporación: PBS; MgCl_2 0,5 mM; CaCl_2 0,1 mM.

Buffer Tris-Glicina-SDS 10X: (1 litro) Tris base 30,3 g; glicina 144 g; SDS 1% (v/v).

Buffer Tris-Glicina 10X: (1 litro) Tris base 30,3 g; glicina 144 g.

Buffer de transferencia 10X: (1 litro) Tris base 30,3 g; glicina 144 g; metanol 20% (v/v).

Buffer T-PBS: PBS; Tween 20 0,05% (v/v).

Buffer T-PBS-leche: PBS; Tween 20 0,05% (v/v); leche descremada en polvo 5% (p/v).

Buffer de lisis para parásitos: Tris 10 mM pH 7,5; EDTA 100 mM; SDS 0,1% (p/v).

Buffer Inoue: (1 litro) $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10,88 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,2 g; KCl 18,65 g; PIPES (0,5 M pH 6,7) 10 ml. Se llevó a volumen con agua destilada y se esterilizó por filtración.

Buffer de unión a anexina: 10 mM HEPES; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl_2 , pH 7,4.

Solución de tinción con azul brillante de Coomassie: Coomassie R-250 0,25% (p/v); metanol 30% (v/v); ácido acético glacial 10% (v/v).

Solución decolorante: metanol 50% (v/v); ácido acético glacial 10% (v/v); agua 40% (v/v).

Medios de cultivo

Medios de cultivo para Trypanosoma cruzi:

Medio BHT (epimastigotes): (1 litro) extracto cerebro-corazón 33 g; triptosa 5 g; KCl 0,4 g; Na₂HPO₄ 4 g; glucosa 0,3 g. Llevar a pH 7,4. Se autoclavó a 121 °C por 20 minutos. Antes de utilizar se completó con suero fetal bovino 10% (v/v), estreptomycin 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml y hemina 20 µg/ml (BHT-10% SFB).

Medio SDM-79 (Brun & Schönenberger, 1979) (epimastigotes): El medio fue amablemente cedido por la Dra. Carolina Carrillo del Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein. Después de esterilizar por filtración, se suplementó con suero fetal bovino 10% (v/v), estreptomycin 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml y hemina 20 µg/ml.

Medio TAU puro (metacicloogénesis): 190 mM NaCl; 17 mM KCl; 2 mM MgCl; 2 mM CaCl₂; 8 mM; PBS pH 6. Se esterilizó por filtración.

Medio TAU 3AAG (metacicloogénesis): se adicionó al medio TAU puro 10 mM glucosa; 2 mM ácido aspártico; 50 mM ácido glutámico; 10 mM L-prolina (pH 6). Se esterilizó por filtración.

Medios de cultivo para células de mamíferos:

Medio MEM (en inglés, *Minimum Essential Medium*) (Gibco™), contiene L-glutamina. El pH fue ajustado por la adición de bicarbonato de sodio al 0,15 % (p/v). Se esterilizó por filtración y luego se completó con estreptomycin 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml y suero fetal bovino 10% (v/v), (MEM-10% SFB).

Medio RPMI-1640 (en inglés, *Roswell Park Memorial Institute medium*) (Vitrocell™). El pH fue ajustado por la adición de bicarbonato de sodio al 0,15 % (p/v). Se esterilizó por filtración y luego se completó con estreptomycin 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml y suero fetal bovino 10% (v/v), (RPMI-10% SFB).

Para el mantenimiento del ciclo infeccioso de *T. cruzi*, los medios MEM y RPMI fueron suplementados con 3 o 2% (v/v) de suero fetal bovino, respectivamente (MEM-3% SFB, RPMI-2% SFB).

Medios de cultivo para bacterias:

Medio LB (Luria-Bertani): (1 litro) NaCl 5 g, extracto de levadura 5 g, triptona 10 g. Para los medios sólidos se utilizó 2% (p/v) de agar. Se autoclavó a 121 °C por 20 minutos. Para las placas con

antibiótico se utilizó ampicilina (100 µg/ml). Para la selección de bacterias transformadas con pGEM-T easy-inserto de ADN, se colocó en las placas X-Gal (0,2% concentración final).

Medio SOB (en inglés, *Super Optimal Broth*) (para obtener bacterias competentes): (1 litro) NaCl 0,5 g; triptona 20 g; extracto de levadura 5 g; KCl 1M 2,5 ml. Se ajustó el pH a 7 con una solución de NaOH 5N. Se autoclavó a 121 °C por 20 minutos. Antes de usar el medio, se agregó MgCl₂ 2M 5 ml.

Organismos

Cepas de *Trypanosoma cruzi*:

Epimastigotes y tripomastigotes de la cepa Y (UDT TcII).

Cepas bacterianas:

Para el clonado del gen en estudio y para el mantenimiento de los plásmidos utilizados se trabajó con la cepa de *Escherichia coli* DH5α: F- φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk⁻, mk⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA* λ⁻.

Líneas celulares de mamíferos:

Para obtener los estadios de amastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, se realizaron infecciones de células Vero (ATCC CCL-81), derivadas de células epiteliales de riñón de mono verde africano, disponibles en el laboratorio.

Las células CHO-K1 (ATCC CCL-61), derivadas de ovario de hámster chino (en inglés, *Chinese Hamster Ovary*), pertenecen al Departamento de Farmacia de la Universidad de São Paulo de Brasil.

Manipulación de células de mamíferos

Cultivos de células Vero y CHO-K1

Para los mantenimientos de rutina de las células se utilizaron botellas de cultivo de 25 cm² de superficie con un volumen de 5 ml de medio, realizando pasajes dos veces por semana. Las células Vero fueron crecidas en nuestro laboratorio en medio MEM-10% SFB a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5% CO₂. Para el pasaje, las células se disgregaron incubándolas con solución de tripsina-EDTA (0,05% (p/v) tripsina y 1,25 mM EDTA en PBS) a 37 °C durante 5 minutos y sembrando unas 1x10⁴ células por cm².

El mantenimiento de las células CHO-K1 lo realizó la Dr. Carla C. Avila en la Universidad de São Paulo de Brasil. Procedió de la misma manera que para las células Vero pero utilizando el medio RPMI-10% SFB.

Ensayos de citotoxicidad de isotretinoína y Ant4 sobre células de mamíferos

La toxicidad del análogo sintético de poliaminas Ant4 sobre células Vero fue determinada por el ensayo de tinción con cristal violeta (violeta de genciana). Las células (1×10^4 /pocillo) fueron incubadas en una placa de 96 pocillos en un volumen de 150 μ l de medio MEM-10% SFB por 24 horas a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5% CO₂. Luego, se agregaron diferentes concentraciones del compuesto y se incubaron por 24 horas. Al final del tratamiento, las células fueron fijadas con metanol por 15 minutos y teñidas con 0,5% (p/v) de cristal violeta también durante 15 minutos. Después del lavado con agua y del secado de la placa, se midió la absorbancia de las células teñidas a 570 nm.

Para evaluar la citotoxicidad de la isotretinoína en células CHO-K1 y en monocitos de sangre periférica, las células se expusieron a la droga durante 24 horas. Para medir la viabilidad celular se procedió de la misma manera que para las células Vero. Este ensayo fue hecho por la Dr. Carla C. Avila. Nuestro grupo de trabajo participó en el análisis de los resultados.

Manipulación de bacterias

Cultivo de bacterias

Las bacterias se crecieron en placas de cultivo o en tubos de 15 o 50 ml en medio rico LB a 37 °C. En el caso de bacterias transformadas con plásmidos, se agregó el antibiótico correspondiente.

Bacterias competentes

Se inocularon 3 erlenmeyers conteniendo 250 ml de medio SOB con 10 ml, 4 ml y 2 ml de un cultivo de *E. coli* saturado, respectivamente. Se incubaron a 18-22 °C con agitación moderada. La densidad óptica fue monitoreada a 600 nm y el primer cultivo en alcanzar una absorbancia de 0,55 OD₆₀₀/ml fue colocado en hielo por 10 minutos. Se cosecharon las células por centrifugación a 2.500 x g durante 10 minutos a 4 °C. Luego se resuspendieron las bacterias suavemente en 80 ml de solución Inoue fría. Nuevamente se centrifugó la suspensión a 2.500 x g durante 10 minutos a 4 °C y las bacterias fueron suavemente resuspendidas en 20 ml de solución Inoue fría. Se agregaron 1,5 ml de DMSO, se dividió

la suspensión en alícuotas en tubos estériles, los cuales fueron inmediatamente congelados en un baño de nitrógeno líquido. Los tubos se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización (Inoue *et al.*, 1990).

Transformación de bacterias

Las bacterias fueron transformadas por el método de “Shock-Térmico”: las bacterias competentes fueron incubadas con el ADN durante 15 minutos en hielo y sometidas a un golpe térmico a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 segundos. Rápidamente fueron recuperadas con el agregado de 1 ml de medio LB incubando a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Finalmente fueron centrifugadas a baja velocidad y sembradas en placas con LB agar conteniendo el antibiótico correspondiente. Se realizaron controles de viabilidad.

Manipulación de parásitos

Cultivos de *T. cruzi*

Se cultivaron epimastigotes de *T. cruzi* en medio BHT-10% SFB a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ en botellas de 25 cm^2 . Los cultivos se repicaron cada 7 días en una dilución 1:10. Los epimastigotes transgénicos se cultivaron en las mismas condiciones con el agregado de neomicina ($500\text{ }\mu\text{g/ml}$).

Para evaluar el estado y la densidad de los cultivos de parásitos se los observó en el microscopio utilizando una cámara hemocitométrica (cámara de Neubauer).

Para realizar las infecciones con *T. cruzi* se utilizaron células Vero mantenidas en medio MEM-10% SFB a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera húmeda conteniendo 5% CO_2 . Amastigotes y tripomastigotes derivados de células se obtuvieron después de infectar una monocapa de células Vero con tripomastigotes. Se utilizó un período de infección de 24 horas, posterior al cual, los tripomastigotes que no fueron internalizados, fueron removidos por lavado de las células con PBS. Los tripomastigotes derivados de células fueron usados para los ensayos de viabilidad y de transporte de poliaminas.

Para el mantenimiento del ciclo infectivo de *T. cruzi*, se utilizaron botellas de cultivo de 25 cm^2 de superficie con un volumen de 5 ml de MEM-3% SFB donde se sembraron 4×10^5 células Vero con 2 ml de cultivo de tripomastigotes provenientes de una infección anterior.

Las infecciones con parásitos de *T. cruzi* en células CHO-K1 fueron realizadas por la Dr. Carla C. Avila en la Universidad de São Paulo de Brasil. Los tripomastigotes metacíclicos los obtuvieron de la siguiente manera:

A partir de un cultivo en fase exponencial, se largó un cultivo de 5×10^6 parásitos/ml y se lo mantuvo durante 4 días en medio BHT-10% SFB. Luego, se verificó que los parásitos estén en fase

estacionaria y sin tripomastigotes. El cultivo se centrifugó a 2.000 x g durante 5 minutos para retirar el medio y fue lavado con medio TAU puro. Se añadió 5×10^7 parásitos/ml en 15 ml de medio TAU puro en un tubo cónico y se mantuvo por 2 horas a 28 °C. El cultivo fue centrifugado y resuspendido en TAU 3AAG. Los parásitos se transfirieron a una botella de cultivo de 75 cm² de superficie y se mantuvieron a 28 °C. Se contó diariamente el número de tripomastigotes/ epimastigotes.

Las infecciones con *T. cruzi* en células CHO-K1 en medio RPMI se realizaron de la misma manera que para las células Vero.

Evaluación de la actividad tripanocida

Tratamiento sobre el estadio epimastigote

Para evaluar el efecto de la isotretinoína y de los análogos de poliaminas sobre el crecimiento del estadio epimastigote, se monitorearon cultivos de parásitos comenzando con una dilución inicial de 7×10^6 células/ ml en un volumen de 1,5 ml de BHT-10% SFB con distintas concentraciones de los compuestos (sección de resultados) en una placa de 24 pocillos durante 96 horas a 28 °C. El crecimiento de los epimastigotes se monitoreó tomando muestras periódicamente y contando la cantidad de parásitos en cámaras de Neubauer con el objetivo de calcular las concentraciones capaces de inhibir 50% el crecimiento de los parásitos (IC₅₀).

*Tratamiento sobre células infectadas con *T. cruzi**

Los ensayos para estudiar la toxicidad de la isotretinoína sobre células infectadas con el parásito fueron realizados por la Dr. Carla C. Avila en la Universidad de São Paulo de Brasil. Nuestro grupo de trabajo participó en el análisis de los resultados.

Se incubaron células CHO-K1 (5×10^4 /pocillo) en placas de 24 pocillos en un volumen de 500 µl de medio RPMI-10% SFB por 24 horas a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5% CO₂. Luego, las células se infectaron con tripomastigotes (derivados de células) en la proporción 50:1 (tripomastigotes/células CHO-K1), se incubaron durante 4 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Luego, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y se les agregó 500 µl de RPMI-10% SFB con las concentraciones de isotretinoína indicadas en la sección de resultados. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, 5% de CO₂ se lavaron 2 veces con PBS y se agregó 500 µl de medio RPMI-2% SFB y las diferentes concentraciones de la droga, se incubaron a 33 °C, 5% de CO₂ hasta el final del ensayo. Se contaron los tripomastigotes en cámaras de Neubauer del 4^{to} al 6^{to} día después de la infección.

Para medir el efecto de la isotretinoína sobre la replicación de amastigotes (índice de infección), después de 48 horas de la infección, las células CHO-K1 y los parásitos se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 minutos y se tiñeron con el colorante fluorescente de ADN Hoechst, para permitir la visualización de los núcleos de los parásitos y de las células hospedadoras. Las imágenes fueron tomadas por microscopía de fluorescencia. Las células, los amastigotes y las células infectadas se contaron utilizando el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Para evaluar la toxicidad del análogo de poliaminas sobre células infectadas con el parásito, se incubaron células Vero (3×10^4 /pocillo) en placas de 24 pocillos en un volumen de 1 ml de medio MEM-10% SFB por 24 horas a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5% CO₂. Luego, las células se infectaron con tripomastigotes derivados de células (3×10^5 /pocillo) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Las células fueron lavadas 2 veces con PBS y se les agregó 1 ml de MEM-3% SFB con distintas concentraciones del compuesto indicadas en la sección de resultados. Después de 24 horas de incubación se lavaron 2 veces con PBS y se volvió a agregar 1 ml de medio MEM-3% SFB y las diferentes concentraciones de Ant4. Se repitió el procedimiento hasta el 5^{to} día después de la infección, luego se cambió solo el medio sin agregado del compuesto hasta observar tripomastigotes en el sobrenadante. Los mismos se contaron en cámaras de Neubauer con el objetivo de calcular un valor de IC₅₀.

Tratamiento sobre tripomastigotes aislados

Para estudiar el efecto tripanocida del análogo de poliaminas correspondiente sobre el estadio tripomastigote, se incubaron 1×10^6 tripomastigotes/ml en un volumen final de 200 µl de medio MEM-3% SFB con distintas concentraciones del compuesto (indicadas en la sección de resultados) en placas de 96 pocillos. Los parásitos fueron incubados durante 24 horas a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5% CO₂.

Luego, para calcular la IC₅₀ del compuesto se contaron las células en cámaras de Neubauer.

Los tripomastigotes del ensayo se obtuvieron a partir de células infectadas: se tomó el sobrenadante con los parásitos y se centrifugó 5 minutos a 500 x g para descartar las células que podrían estar despegadas. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó 15 minutos a 3.000 x g. El mismo se dejó en reposo 2 horas a 37 °C, 5% de CO₂ para que los tripomastigotes se separen del *pellet* (*swim-up*). Se tomó el sobrenadante con los parásitos y se los contó en cámaras de Neubauer.

Ensayo de viabilidad por reducción del compuesto MTT (sal de tetrazolio)

El efecto de la pentamidina sobre la viabilidad de los tripomastigotes se evaluó mediante el ensayo de reducción del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio) (Mosmann, 1983). Se agregó 10 µl de 5 mg/ml de MTT más 0,22 mg/ml de metosulfato de fenazina (portador de electrones) en microplacas de 96 pocillos conteniendo 10^6 parásitos en 100 µl del medio RPMI-1640 sin rojo de fenol, tratados previamente con la droga. Luego de la incubación por 4 horas a 37 °C, los cristales de formazano generados fueron disueltos con 100 µl de 10% (p/v) de SDS en 0,01 M de HCl. Las microplacas se incubaron durante toda la noche a 37 °C, y la DO fue determinada en un lector de placa a una longitud de onda de 570 nm. En estas condiciones la DO es directamente proporcional al número de células viables en cada pocillo.

Determinación de tioles en epimastigotes tratados con pentamidina

Para evaluar los niveles de tripanotión en epimastigotes expuestos a la pentamidina, los parásitos fueron cultivados en PBS con glucosa (5 g/l) durante 24 horas a 27 °C, para disminuir el contenido intracelular de tripanotión. Luego, el cultivo fue suplementado con 50 µM de putrescina y 100 µM de éster etílico de glutatión (GSH-MEE) para permitir que los parásitos recuperen la síntesis de tripanotión. También se agregó pentamidina (10 y 50 µM) al mismo tiempo que la putrescina. Después de 6 horas de incubación a 27 °C se recolectaron los parásitos y se midió el contenido de tioles mediante derivación con monobromobimano y separación del aducto fluorescente por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Maya *et al.*, 1997; Faundez *et al.*, 2005). Las longitudes de onda de emisión y excitación fueron de 480 y 385 nm, respectivamente. Este método detecta los tioles libres reducidos pero no los disulfuros. Esta medición fue realizada por el Dr. López-Muñoz en la Universidad de Chile.

Transfección de epimastigotes y selección

Aproximadamente 10^8 parásitos fueron recolectados por centrifugación a 3.000 x g durante 5 minutos, lavados una vez con buffer de electroporación y resuspendidos en 350 µl del mismo buffer, manteniendo la esterilidad. Los parásitos fueron depositados en una cubeta para electroporación de 0,2 cm de espesor (BioRad) junto con 50 µg del ADN plasmídico a transfectar suspendido en buffer TE. Se sometieron a un pulso de 400 V y 500 µF con una constante de tiempo resultante de aproximadamente 5 milisegundos y colocados en una botella de 25 cm² conteniendo 5 ml de BHT-10% SFB. Luego de 24 horas de incubación a 28 °C se comenzó el proceso de selección con el agregado

del antibiótico correspondiente a la resistencia presente en la construcción plasmídica utilizada. Cuando los parásitos comenzaron a crecer fueron repicados manteniendo la concentración de droga.

Manipulación y obtención de ADN

Preparación de ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi*

Un cultivo de 1-2 ml de epimastigotes en fase logarítmica tardía fue centrifugado a 2.000 x g durante 5 minutos y lavado con PBS. Los parásitos fueron resuspendidos en 1ml de buffer de lisis, se les agregó 0,5 ml de PIC y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 12.000 x g por 1 minuto y se volvió a repetir la extracción con PIC. Luego se extrajo con 0,5 ml de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) y se precipitó el ADN con el agregado de un volumen de isopropanol centrifugando durante 20 minutos a máxima velocidad. El *pellet* se lavó con etanol al 70% (v/v) y se resuspendió en 100-200 µl de agua.

Preparación de ARN total de epimastigotes de *T. cruzi*

Se siguieron las especificaciones del fabricante del TriReagent (Sigma Aldrich) que se basa en el método de isoticianato de guanidina y fenol/cloroformo. Se utilizó 1 ml de TriReagent por cada 2 x 10⁸ parásitos. El ARN fue precipitado con 700 µl de isopropanol y se centrifugó a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C seguido por un lavado de 5 minutos con etanol 75%. El ARN fue secado bajo lámpara y resuspendido en 30 µl de agua. Para efectuar la cuantificación por espectrofotometría directa se utilizó la absorbancia a 260 nm considerando que bajo condiciones estándares de medición 1 unidad de absorbancia a 260 nm representan 40 µg/ml. La pureza se analizó gracias a la relación de absorbancia a 260 nm/absorbancia a 280 nm que idealmente debe ser entre 1,6-1,8 y la integridad fue comprobada mediante geles desnaturalizantes de agarosa.

Cuando el ARN fue utilizado para RT-PCR se adicionó un paso de tratamiento con 1U de ADNasa (Sigma) durante 20 minutos a temperatura ambiente para evitar la contaminación con ADN genómico.

Obtención de ADN plasmídico

El ADN plasmídico fue purificado mediante un protocolo adaptado del método de lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979). A partir de 3 ml de cultivo saturado de *E. coli*, se cosecharon las bacterias por centrifugación a 15.000 x g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado bacteriano en 100 µl de solución de resuspensión PI con vigorosa agitación. Se adicionaron 200 µl de solución PII y se homogenizó cuidadosamente, provocando la ruptura celular

con la consiguiente liberación y desnaturalización de ADN genómico y plasmídico. Se renaturalizó el ADN por el agregado de la solución PIII, se homogenizó cuidadosamente y se centrifugó a 16.000 x g durante 10 minutos, provocando la renaturalización desorganizada y la precipitación del ADN genómico. Se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 0,5 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se emulsionaron las fases mediante fuerte agitación y se centrifugó a 16.000 x g durante 1 minuto. Se recuperó la fase acuosa y se repitió la extracción orgánica. Finalmente se precipitó el ADN plasmídico por el agregado de 0,5 ml de isopropanol, homogenización y centrifugación por 15 minutos a 16.000 x g. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado obtenido con etanol 70% (v/v) y posterior centrifugación a 16.000 x g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN plasmídico se resuspendió en 32 μ l de agua. El ADN así purificado fue utilizado en digestiones analíticas y preparativas durante la construcción de los diferentes vectores de este trabajo.

Para preparar ADN de alta pureza para secuenciar se prosiguió con el agregado de 8 μ l de NaCl 4 M y 40 μ l de PEG 8000 13% estéril. Se mezcló vigorosamente y se incubó en hielo al menos durante 20 minutos. Se centrifugó a máxima velocidad por 15 minutos a 4 °C. El precipitado se lavó con etanol 70% (v/v), se secó y se resuspendió en 20 μ l de agua estéril.

Secuenciación de ADN

Los plásmidos a analizar fueron debidamente amplificados en cultivos de *E. coli*, purificados por precipitación con PEG, cuantificados, diluidos a 200 ng/ μ l y enviados a Macrogen Inc (Seúl, Corea) donde fueron secuenciados.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR con Taq ADN polimerasa (Promega) fueron llevadas a cabo en el buffer provisto por los fabricantes con 10 - 1000 ng de ADN, 2 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs y 10 pmol de cada oligonucleótido en un volumen final de 50 μ l. Las amplificaciones se realizaron de acuerdo a los siguientes ciclos: a) Desnaturalización inicial: 5 minutos a 95 °C; b) 30 ciclos. Desnaturalización: 30 segundos a 95 °C; Anidado: 1 minuto a la temperatura indicada para cada par de oligonucleótidos; Elongación: 1 minuto por cada Kpb a amplificar a 72 °C; c) Elongación final: 10 minutos a 72 °C. Se realizaron controles de amplificación y de contaminación. El equipo de PCR utilizado fue un termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf). La amplificación se chequeó por electroforesis en agarosa. La temperatura de anidado utilizada fue la sugerida por el programa Vector NTI Advance®

v.10 (Invitrogen) teniendo en cuenta la composición de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de ADN.

Transcripción Reversa y amplificación mediante PCR (RT-PCR)

La síntesis de ADNc se realizó por transcripción reversa utilizando como molde entre 10-700 ng de ARN total de epimastigotes de *T. cruzi*. La enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega) se utilizó en todas las reacciones en la solución indicada por el fabricante, con 5 mM de MgCl₂, 4 mM de dNTPs, un inhibidor de ARNasas (RNAsin, Promega) y 5 μM del oligonucleótido adecuado, en un volumen final de 20 μl. La reacción se incubó por 30 minutos a 37 °C y luego la enzima se inactivó por calentamiento durante 15 min a 95 °C.

El producto de esta reacción fue utilizado como templado para la amplificación por PCR.

Digestión de ADN con enzimas de restricción

Para la digestión de los diferentes plásmidos y de los productos de PCR se emplearon las enzimas de restricción de New England Biolabs (NEB) y de Promega. Se utilizaron 5 U de enzima por μg de ADN a digerir incubando en los buffers y temperatura sugeridos por el fabricante durante un mínimo de 3 horas.

Preparación de vectores y fragmentos de ADN

Los vectores utilizados fueron digeridos con las enzimas de restricción indicadas y purificados mediante electroforesis en geles de agarosa. Las bandas correspondientes fueron aisladas y extraídas con el kit de extracción "Gen Elute™ Gel Extraction Kit" (Sigma Aldrich) según las instrucciones del fabricante. Para la purificación de productos de PCR se utilizaron las mismas columnas comerciales.

Ligación de fragmentos de ADN

Las ligaciones se realizaron con una relación molar inserto:vector de 3:1 utilizando 50 ng de vector en un volumen final de 20 μl con 100 U de T4 ADN ligasa (NEB). Las incubaciones fueron realizadas a 4 °C durante toda la noche.

Para la ligación de productos de PCR al vector pGEM-T easy (Promega) se prosiguió de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las diferentes muestras de ADN (plásmidos, fragmentos de restricción y productos de PCR) fueron resueltas mediante electroforesis en geles de agarosa. Los geles utilizados se prepararon en buffer TAE al 1 % (v/v) de acuerdo al tamaño de banda a visualizar, con 0,5 μg/ml de bromuro de etidio. Las

corridas electroforéticas se realizaron en el mismo buffer a un voltaje constante de 10 V/cm. Antes de la siembra, las muestras se resuspendieron con el correspondiente volumen de buffer de siembra 6X. Los geles fueron visualizados y documentados en un transiluminador (UVP).

Técnicas para análisis de proteínas

Preparación de extractos de epimastigotes

Para los ensayos de *Western blot* los parásitos fueron contados, lavados dos veces con PBS y resuspendidos directamente en buffer de siembra 1X a una densidad de $2-5 \times 10^8$ parásitos/ml.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% (p/v) en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE). Las muestras diluidas en buffer de siembra 1X se prepararon calentándolas por 5 minutos a 100 °C. Luego se sembraron en un sistema discontinuo que consta de un gel de concentración (5% (p/v) poliacrilamida en 0,125 M Tris:HCl pH 6,8 y 0,1% (p/v) SDS) seguido por un gel de separación (15% (p/v) poliacrilamida en 0,375 M Tris:HCl pH 8,8 y 0,1% (p/v) SDS). Como iniciador de la reacción de polimerización se utilizó TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador de ésta el ión persulfato ($S_2O_8^{2-}$) que se añadió en forma de persulfato de amonio (APS, preparado al 10% (p/v)). Las muestras se corrieron en buffer Tris-Glicina-SDS 1X (Laemmli, 1970). Los marcadores de peso molecular utilizados cubrían los rangos de 14,3 a 200 kDa (High range, Rainbow, Low range, BioRad). Se utilizó el equipo miniPROTEAN 3 BioRad. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y luego lavados con solución decolorante.

Western blot

Las muestras a analizar por *Western blot* fueron resueltas en geles de acrilamida desnaturalizantes (15%) y transferidas a membranas PVDF (Pierce), previamente activadas con metanol, durante 1 hora a 100 V en un equipo de transferencia semi-seca (Trans-Blot SD, BioRad). La transferencia se realizó en buffer Tris-Glicina 1X. Se controló la eficiencia de la transferencia por tinción reversible de la membrana con el colorante Rojo Ponceau. Luego de lavar con agua, las membranas fueron bloqueadas en buffer T-PBS con 5 % (p/v) de leche en polvo descremada durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación e incubadas con el anticuerpo primario (α -GDH hecho en conejo) diluido en solución de bloqueo (1:5.000) por 12 horas a 4 °C. El anticuerpo primario fue amablemente provisto por el Dr. Juan José Cazzulo del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-INTECH) de

la Universidad Nacional de San Martín. Posteriormente las membranas fueron lavadas 3 veces con T-PBS e incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rabanito (HRP, *HorseRadish Peroxidase*) (α -conejo HRP) diluido en solución de bloqueo (1:5.000) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las membranas fueron lavadas 3 veces con T-PBS y reveladas con el reactivo para quimioluminiscencia Supersignal™ West Pico (Pierce).

Ensayos con un modelo de parásitos sobre-expresando el transportador de poliaminas TcPAT12

Determinación de la concentración de poliaminas intracelulares

El sobrenadante de los extractos celulares, obtenido por precipitación con 0,2 M de ácido tricloroacético, fue utilizado para la determinación de poliaminas intracelulares, mediante tratamiento con cloruro de benzoilo. Los derivados benzoilados fueron separados por HPLC, en columna de fase reversa C₁₈ (Beckam) y los picos obtenidos se detectaron por espectrofotometría por absorción de luz UV a 254 nm (Morgan, 1998).

Efectos de la disponibilidad de poliaminas sobre el crecimiento de los parásitos

Para evaluar si los parásitos TcPAT12 sobreviven en un medio con bajos niveles de poliaminas, se monitorearon cultivos de epimastigotes, en fase exponencial de crecimiento, a una dilución inicial de 5×10^6 parásitos/ml en un volumen de 5 ml de medio pobre en poliaminas aportadas por el suero fetal bovino (SDM-79) con y sin agregado de putrescina 0,2 mM en botellas de 25 cm² a 28 °C. La densidad celular fue registrada durante 18 días contando la cantidad de parásitos en cámaras de Neubauer.

Tratamiento con peróxido de hidrógeno

Para los ensayos de estrés oxidativo, se recolectaron epimastigotes sobre-expresando el TcPAT12 en fase exponencial, se los lavó dos veces con PBS y se los resuspendió en el mismo buffer. Se colocaron alícuotas de 300 μ l con 2×10^6 parásitos en placas de 24 pocillos y se los incubó durante 2 horas a 28 °C con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (sección de resultados). Luego de ese período se agregó medio de cultivo BHT-10% SFB en un volumen final de 1,5 ml. Se monitoreó el crecimiento de los cultivos durante 96 horas contando la cantidad de parásitos en cámaras de Neubauer a fin de determinar la concentración de peróxido de hidrógeno necesaria para disminuir el

crecimiento al 50% (IC_{50}). Como control negativo se realizó el mismo procedimiento pero sin agregado de peróxido.

Tratamiento con drogas tripanocidas

Para estudiar el efecto de las drogas tripanocidas, nifurtimox y benznidazol, sobre el crecimiento de los parásitos TcPAT12, se recolectaron epimastigotes provenientes de un cultivo en fase logarítmica, se los lavó dos veces con PBS y se los resuspendió en medio de cultivo BHT-10% SFB. Se los colocó en placas de 24 pocillos en una densidad final de $1,3 \times 10^6$ parásitos/ml, y se los incubó con distintas concentraciones de nifurtimox o benznidazol (sección de resultados), en un volumen de 1,5 ml de BHT-10% SFB durante 96 horas a 28 °C. Los parásitos se contaron en cámaras de Neubauer con el fin de calcular los valores de IC_{50} de ambas drogas. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento pero en lugar de agregar las drogas, se agregó el mismo volumen de DMSO, que fue el solvente en el que se prepararon las mismas.

Medición de tioles

Los tioles totales, incluyendo los de bajo peso molecular, fueron cuantificados utilizando un ensayo con el reactivo de Ellman o DTNB, 5,5'-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzoico) (Ellman, 1959). Esta técnica espectrofotométrica consiste en una reacción de óxido-reducción entre los tioles libres y el compuesto DNTB, que produce 1 mol de 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB^{2-}) por cada mol de tioles libres (-SH). El anión TNB^{2-} genera una coloración amarilla detectada a 412 nm de longitud de onda. Muestras de 5×10^7 parásitos fueron lavadas con PBS y resuspendidas en buffer Tris conteniendo 1% de tritón X-100 y 10 mM de EDTA e incubadas a 4 °C durante 10 minutos. Luego de ser centrifugadas, los tioles presentes en 20 μ l del sobrenadante se mezclaron con 80 μ l del reactivo DNTB (Sigma-Aldrich). El reactivo se preparó en solución de fosfato de sodio 100 mM, EDTA 1 mM, pH 8. Luego de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 412 nm. Para la determinación de tioles se realizó una curva de calibración usando L-cisteína clorhidrato, en un rango de concentración final de 0-150 μ M.

Estudios de la isotretinoína en *T. cruzi*

Preparación de la droga

La solución *stock* de la isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico, Sigma-Aldrich) se preparó a partir de la droga sólida, disolviendo la misma en DMSO a una concentración final de 30 mM. Se conservó a -20 °C y protegida de la luz.

Ensayo de permeabilidad de la membrana plasmática

Para evaluar si la isotretinoína afecta la permeabilidad de la membrana celular, se recolectaron 5×10^8 epimastigotes provenientes de un cultivo en fase logarítmica, se los lavó dos veces con PBS y se los resuspendió en el mismo buffer. Se tomaron alícuotas de 100 μ l con 10^8 parásitos a las cuales se les agregó 100 μ l de PBS conteniendo diferentes concentraciones de isotretinoína indicadas en la sección de resultados. Todos los tubos fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se centrifugaron a 12.000 x g por 2 minutos, los sobrenadantes se mantuvieron en hielo y los *pellets* fueron lavados dos veces con PBS y resuspendidos en 200 μ l del mismo buffer.

Como control positivo se llevó a cabo una permeabilización de epimastigotes con digitonina (Bouvier *et al.*, 2006); las células se lavaron dos veces con PBS y se las resuspendió en buffer Tris- HCl 50 mM pH 7,5 con 250 mM de sacarosa y 10 μ M de E-64. Se tomaron alícuotas de 100 μ l con 10^8 parásitos a las cuales se les agregó 100 μ l del mismo buffer conteniendo 0 y 0,3 mg/ml de digitonina. Después de 2,5 minutos de incubación a temperatura ambiente, los tubos se centrifugaron a 12.000 x g por 2 minutos. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos y los *pellets* fueron lavados dos veces y resuspendidos en el mismo buffer. Las muestras fueron analizadas mediante un ensayo de *Western blot*. El patrón de extracción de GDH dependiente de NADP⁺ que se localiza en el citoplasma de los parásitos se usó como marcador de estabilidad/permeabilidad de la membrana plasmática.

Determinación del mecanismo tripanocida en epimastigotes

Citometría de flujo

Esta técnica se realizó en conjunto con la Dra. Patricia Bustos en el Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chabén”.

Para determinar la presencia de un mecanismo de muerte celular programada en epimastigotes tratados con isotretinoína, se evaluó la exposición de fosfatidilserina y la exclusión de yoduro de propidio por citometría de flujo. Primero los parásitos (1×10^7) fueron expuestos a diferentes concentraciones de isotretinoína indicadas en la sección de resultados. Luego las células fueron lavadas 2 veces con PBS y resuspendidas en 500 μ l de buffer de unión de anexina. Como control

positivo de la técnica se utilizaron parásitos incubados en un baño térmico a 80 °C por 1 minuto para asegurarse la unión de los marcadores a los mismos, y como control negativo, parásitos sin tratar con los marcadores. Las muestras se pasaron a tubos de citometría de flujo y se incubaron con anexina V-FITC (*Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit* de Sigma-Aldrich) y ioduro de propidio durante 15 minutos en oscuridad. La fluorescencia se detectó en el equipo FACSCalibur (Becton Dickinson & Co., NJ, USA) y los resultados fueron analizados con el software Cyflogic (Jimenez *et al.*, 2008).

TUNEL

Para un análisis de apoptosis se llevó a cabo la técnica de TUNEL (en inglés, *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). Primero se trataron 1×10^7 epimastigotes provenientes de un cultivo en fase exponencial, con las concentraciones de isotretinoína indicadas en la sección de resultados, a 28 °C. Se tomaron 5×10^6 de los epimastigotes tratados, se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en 200 μ l del mismo buffer. Después de asentar las células por 20 minutos en portaobjetos revestidos con poli-L-lisina, se fijaron durante 20 minutos con paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS. Se lavaron dos veces con el mismo buffer y se permeabilizaron con tritón X-100 al 0,1% en PBS por 10 minutos. Se realizaron controles positivos y negativos usando ADNasa I y parásitos no tratados con la droga, respectivamente. Para el control positivo los parásitos se incubaron por 20 minutos con 1 U/ml de ADNasa I en PBS y 1mg/ml de BSA a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS, se incubaron con 50 μ l del reactivo (*In situ cell death detection Kit* de Roche) que contiene la enzima transferasa deoxinucleotidil terminal y dUTP marcado con fluoresceína, por 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Los parásitos se volvieron a lavar 3 veces con PBS y fueron montados con líquido de montaje Vectashield (Vector Labs) conteniendo DAPI. Los mismos se observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX60 con una configuración orientada a la microscopía de tripanosomátidos. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital monocromática modelo Olympus XM10 con un sensor CCD Sony.

Monodancilcadaverina

La autofagia se evaluó utilizando el marcador fluorescente específico para vacuolas autofágicas denominado monodancilcadaverina (MDC) (Biederbick *et al.*, 1995). Se trataron 1×10^7 epimastigotes provenientes de un cultivo en fase exponencial con isotretinoína durante 6 horas a 28 °C. Después de lavarlos con PBS, se resuspendieron en el mismo buffer, se incubaron con 0,05 mM de MDC a 37 °C durante 15 minutos y luego se lavaron dos veces con PBS. La tinción del MDC se analizó usando un microscopio de fluorescencia como el descrito en la técnica anterior.

Bromuro de etidio y naranja de acridina

Para detectar cuerpos apoptóticos, epimastigotes (1×10^7) tratados con isotretinoína durante 6 horas a 28 °C, fueron lavados con PBS y resuspendidos en el mismo buffer. Luego, los cultivos se tiñeron con los marcadores de ADN, bromuro de etidio y naranja de acridina, diluidos en PBS. Las muestras fueron observadas en el momento mediante un microscopio de fluorescencia como el descrito anteriormente. El bromuro de etidio sólo entra en células muertas y tiñe la cromatina y los cuerpos apoptóticos con un color anaranjado. En cambio, el colorante naranja de acridina ingresa en las células vivas y muertas y se vuelve verde cuando se intercala con el ADN (Franco *et al.*, 2002).

Inmunofluorescencia indirecta

Para estudiar la formación de estructuras autofágicas mediante inmunofluorescencia indirecta, se recolectaron 5×10^7 epimastigotes tratados con isotretinoína durante 6 horas a 28 °C, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 500 µl del mismo buffer. Se colocaron 200 µl de la suspensión en portaobjetos pre-tratados con poli-L-lisina durante 20 minutos. Los parásitos adheridos al vidrio se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS por 20 minutos y se permeabilizaron con metanol a -4 °C por 5 minutos. Luego, las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon durante 10 min con BSA al 1% (p/v) en PBS. Luego, en una cámara húmeda, se incubó durante 2 horas con el anticuerpo primario (policlonal de conejo anti-Atg8.1) diluido en la solución de bloqueo (1:250). El anticuerpo primario fue amablemente provisto por la Dra. Vanina E. Alvarez del IIB-INTECH de la Universidad Nacional de San Martín. La proteína TcAtg8.1 es un marcador de membrana autofagosomal de *T. cruzi* (Alvarez *et al.*, 2008). Después de lavar los parásitos 3 veces con PBS, se incubó durante 30 minutos con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con FITC en solución de bloqueo a una dilución de 1:500. Los parásitos fueron lavados tres veces con PBS y montados con líquido de montaje Vectashield (Vector Labs) conteniendo DAPI. Se observaron los parásitos en un microscopio de fluorescencia como el descrito anteriormente.

Estudios utilizando análogos sintéticos de poliaminas en *T. cruzi*

Preparación de los compuestos

Los análogos sintéticos de poliaminas fueron gentilmente provistos por el Dr. Otto Phanstiel de la Universidad de Florida Central de Estados Unidos. A continuación se mencionan los 8 compuestos evaluados en este trabajo (sus estructuras se muestran en resultados):

1. **Trimer44**: $N^1, N^{1'}, N^{1''}$ -(benceno-1,3,5-triol tris(metileno))tris(N^4 (4 aminobutil) butano-1,4-diamina) (Muth *et al.*, 2013).
2. **Trimer44NMe**: $N^1, N^{1'}, N^{1''}$ -(benceno-1,3,5-triol tris(metileno))tris(N^4 (4(metilamino)butil)butano-1,4-diamina) (Muth *et al.*, 2014).
3. **Triamide44**: N^1, N^3, N^5 - tris (4-((4-aminobutil)amino)butil) benceno- 1,3,5 tricarboxamida (Muth *et al.*, 2014).
4. **Triamide444**: N^1, N^3, N^5 -tris(4-((4-((4-aminobutil)amino)butil)amino)butil)benceno 1,3,5-tricarboxamida nonahidrocloruro (Muth *et al.*, 2014).
5. **Triamide343**: N^1, N^3, N^5 - tris (3-((4-((3-aminopropil)amino)butil)amino)propil) benceno- 1,3,5-tricarboxamida nonahidrocloruro (Muth *et al.*, 2014).
6. **Ant4**: N^1 -antraceno-9-ilmetil-butano-1,4-diamina dihidrocloruro (Wang *et al.*, 2003).
7. **Ant44**: N-(4-aminobutil)-N-antraceno-9-ilmetilbutano-1,4-diamina sal de trihidrocloruro (Wang *et al.*, 2003).
8. **AMXT 1501**: D-Lys- ϵ -(palmitoil)- N^1 -espermina, consiste en un esqueleto de lisina-espermina con un sustituyente lipofílico C_{16} añadido al grupo ϵ -amino de la porción de lisina (Burns *et al.*, 2005, 2009).

Las soluciones *stock* de los análogos de poliaminas se prepararon a partir de la droga sólida, disolviendo la misma en PBS a una concentración final de 10 mM y se conservaron a -20°C .

Tratamientos combinados de Ant4 y benznidazol

Se incubaron epimastigotes (1×10^7 parásitos/ml) en un volumen de 1 ml de BHT-10% SFB con benznidazol, Ant4, con la combinación de ambos compuestos o sin tratar como control, en una placa de 24 pocillos durante 96 horas a 28°C . El crecimiento de los parásitos se monitoreó tomando muestras periódicamente y contando la cantidad de células en cámaras de Neubauer.

Ensayos de transporte

Transporte de metabolitos en *T. cruzi*

Transporte en epimastigotes

Se contaron las células en una cámara de Neubauer. Se recolectaron alícuotas de 1×10^7 parásitos y se cosecharon en centrífuga a $2.000 \times g$ durante 5 minutos. Las muestras se lavaron con PBS dos veces, se resuspendieron en $100 \mu\text{l}$ de PBS + glucosa 2% (p/v) y se dejaron a 28°C durante 2 horas, con el fin de disminuir la concentración de sustrato endógeno (Pereira *et al.*, 1999). Se incubaron los parásitos ($100 \mu\text{l}$) con $100 \mu\text{l}$ de la mezcla de transporte (2x) durante el tiempo correspondiente a 28°C . La reacción se detuvo añadiendo $800 \mu\text{l}$ de PBS frío, las células fueron centrifugadas a $12.000 \times g$ durante 1 minuto, y lavadas dos veces con PBS frío. Los *pellets* fueron resuspendidos en $200 \mu\text{l}$ de agua y se añadió líquido de centelleo ($350 \mu\text{l}$) UltimaGold XR (Packard Instrument Co.). Se midió la radioactividad de las células en un contador de centelleo líquido (Beckman). La incorporación inespecífica y el arrastre de marca radioactiva fueron medidos con la mezcla de transporte en el t_0 , o al incubar la muestra a 4°C . La viabilidad de los parásitos se controló mediante visualización en microscopio. Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado.

-Para validar la funcionalidad de los parásitos sobre-expresando el transportador de poliaminas TcPAT12, se llevaron a cabo curvas de transporte de espermidina, putrescina o arginina en función del tiempo. Parásitos sobre-expresando la GFP se utilizaron como control. Para los ensayos de determinación del parámetro cinético K_m (constante de Michaelis-Menten) se ensayaron curvas de transporte de putrescina y espermidina en ambos modelos de parásitos en función de las concentraciones de poliaminas indicadas en la sección de resultados. El resto del ensayo se realizó como se describió anteriormente.

-Para los ensayos de inhibición del transporte de putrescina, prolina, lisina, mezcla de aminoácidos (alanina, prolina, arginina, aspartato, glutamato, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina y valina), glucosa y timidina con isotretinoína, los parásitos se pre-incubaron durante 15 minutos a 28°C con distintas concentraciones de la droga. Luego, se incubaron las células por el tiempo que se indica en cada caso con la mezcla de transporte con el sustrato correspondiente a evaluar. El resto del ensayo se realizó como se describió anteriormente.

-Para los ensayos de inhibición de putrescina y espermidina con los análogos de poliaminas se procedió de la misma manera que para la isotretinoína pero sin pre-incubar.

-Mezcla de transporte 2x para poliaminas: PBS, putrescina o espermidina en las concentraciones correspondientes, y $0,4 \mu\text{Ci}$ de $[^3\text{H}]$ -putrescina o $[^3\text{H}]$ -espermidina (PerkinElmer's NEN® Radiochemicals).

-Mezcla de transporte 2x para mezcla de aminoácidos: PBS, aminoácidos en las concentraciones correspondientes, y 0,4 μCi de [^3H]-aminoácido (PerkinElmer's NEN[®] Radiochemicals).

-Mezcla de transporte 2x para glucosa: PBS, glucosa en la concentración indicada, y 0,4 μCi de [^{14}C]-glucosa (PerkinElmer's NEN[®] Radiochemicals).

-Mezcla de transporte 2x para lisina, prolina, timidina o arginina: PBS, lisina, prolina, timidina o arginina en las concentraciones indicadas en cada caso, y 0,4 μCi de [^3H]-lisina, [^3H]-prolina, [^3H]-timidina o [^3H]-arginina (PerkinElmer's NEN[®] Radiochemicals).

Transporte en tripomastigotes

Para estudiar el transporte de poliaminas en presencia del compuesto correspondiente en el estadio tripomastigote (derivado de células), se recolectaron alícuotas de manera tal que contuvieran 1×10^6 parásitos y se cosecharon en centrífuga a $3.000 \times g$ durante 20 minutos. Las muestras se lavaron con PBS dos veces y se resuspendieron en $100\mu\text{l}$ de PBS con glucosa 2 mM. Se incubaron los parásitos con $100 \mu\text{l}$ de la mezcla de transporte 2x y con el compuesto a las concentraciones y tiempos indicados en cada caso a 37°C . El resto del ensayo se realizó como se describió anteriormente.

-Mezcla de transporte 2x para poliaminas: PBS más glucosa 2 mM, putrescina o espermidina en las concentraciones correspondientes, y 0,4 μCi de [^3H]-putrescina o [^3H]-espermidina (PerkinElmer's NEN[®] Radiochemicals).

Plásmidos utilizados

pGEM-T easy (Promega). Para el clonado de todos los productos de amplificación por PCR de este trabajo se empleó el vector comercial pGEM-T easy (Figura 13). El plásmido se encuentra previamente linealizado con EcoRV y presenta un nucleótido de desoxitimidina en cada extremo 3'. Por complementariedad de bases, la ligación de los fragmentos de PCR amplificados con Taq ADN polimerasa ocurre con elevada eficiencia. A su vez la inserción del fragmento interrumpe el gen β -galactosidasa y al añadir su sustrato X-gal, este no es degradado y las colonias obtenidas son de color blanco, en cambio cuando es hidrolizado produce un compuesto azul.

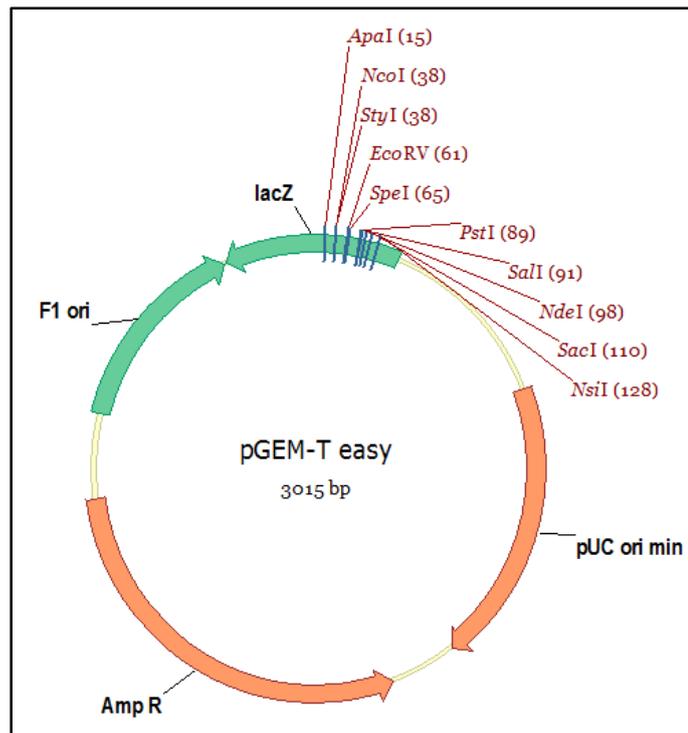


Figura 13. Estructura del plásmido de clonación pGEM-T easy. Se indican la secuencia codificante de la β -lactamasa (Amp R), los orígenes de replicación (F1 ori y pUC ori min), la secuencia codificante para la β -galactosidasa (lacZ) y las enzimas de restricción con corte único del sitio múltiple de clonado. El fabricante linealiza el vector en el sitio EcoRV y agrega una desoxitimidina en cada extremo 3'. Dentro de cada vector figura el tamaño en pb.

pTREX (Vazquez & Levin, 1999). Es un plásmido de expresión para *T. cruzi* derivado del pTEX (Kelly *et al.*, 1992) por incorporación del promotor ribosomal y la secuencia de procesamiento denominada HX1 del locus de los genes TcP2 β (Figura 14). Este plásmido se integra en el locus ribosomal y la transcripción ocurre por la ARN pol I desde su promotor. La presencia de la secuencia HX1 aumenta considerablemente los niveles de procesamiento y por lo tanto de expresión del gen de interés.

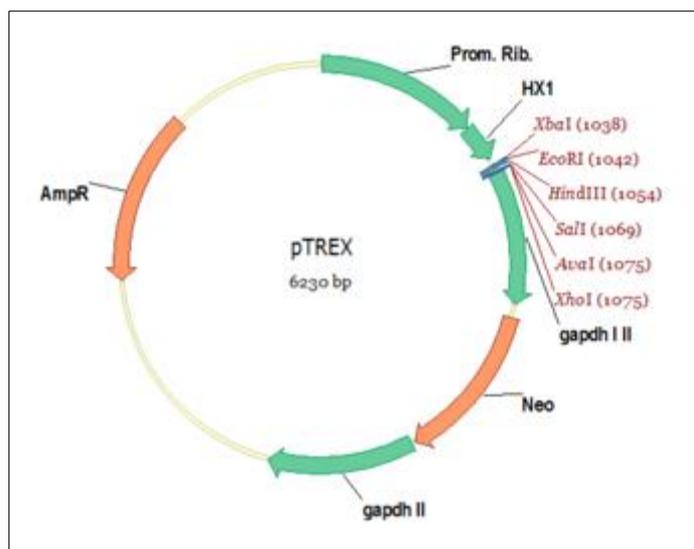


Figura 14. Vector de expresión para *T. cruzi* utilizado, pTREX. Se indican la secuencia codificante de la β -lactamasa (AmpR), el promotor ribosomal (Prom. Rib.), la secuencia señal de *trans-splicing*, HX1, las secuencias intergénicas de los genes de la GAPDH I y II (gapdh I II y II), el gen cuya proteína confiere resistencia a G418 (Neo), y las enzimas de restricción con corte único del sitio múltiple de clonado. Dentro del vector figura el tamaño en pb.

Construcciones genéticas

pGEM-T easy-TcPAT12. Se amplificó el gen TcPAT12 (TcCLB.504213.110) a partir de ADN genómico de *T. cruzi*, fue clonado en el plásmido pGEM-T easy y luego secuenciado para verificar la correcta amplificación. Esta construcción se utilizó como paso intermediario para la generación de otros plásmidos. La amplificación se realizó con los siguientes oligonucleótidos:

-TcPAT12F: 5'-GAATTCATGAATCCCGGTGGTG- 3' (EcoRI)

-TcPAT12R: 5'-CTCGAGGTCGACGGTATCGATAAG- 3' (XhoI)

Las secuencias subrayadas indican los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción anotadas en paréntesis.

pTREX-TcPAT12. Se generó el plásmido pTREX-TcPAT12 a partir de la ligación de los productos de digestión de las construcciones pGEM-T easy-TcPAT12 (inserto) y pTREX (vector). Las enzimas de restricción utilizadas fueron EcoRI y XhoI. La correcta ligación fue verificada por dos digestiones diferentes con enzimas de restricción. El mismo vector con la proteína verde fluorescente, GFP, (pTREX-GFP) fue usado como control.

Técnicas bioinformáticas

Búsqueda de secuencias y análisis predictivos

Las secuencias de los genes utilizados fueron obtenidas de la base de datos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>).

TcPAT12: TcCLB.504213.110; TcPT-2: TcCLB.509551.20; TcPT-3: TcCLB.506773.90; TcPT-4: TcCLB.506833.70; TcPT-5: TcCLB.506831.20; TcPT-6: TcCLB.509733.160.

El armado de las diferentes construcciones plasmídicas, el análisis de las secuencias de ADN y el diseño de oligonucleótidos fue llevado a cabo mediante el programa Vector NTI Advance® v.10 (Invitrogen).

Los alineamientos locales se realizaron con el programa BLAST disponible en el NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y con el Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Los árboles filogenéticos fueron realizados con el software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) y con los programas Clustal Omega (Aiyar, 2000) y TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) (Page, 1996). Para el análisis de sintenia y la identificación de los motivos se utilizó la base de datos TriTrypDB y el algoritmo “*Multiple EM for Motif Elicitation*” (MEME), respectivamente (Bailey *et al.*, 2006).

El análisis de predicción de los pasos transmembrana de los transportadores se realizó con el programa TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se/>, Tsirigos *et al.* 2015) y el diagrama de la proteína se realizó con el programa RbDe (<http://icb.med.cornell.edu/services/rbde/diagrams>).

Rastreo virtual (*virtual screening*)

El rastreo virtual comprende un conjunto heterogéneo de técnicas computacionales o algoritmos que permiten priorizar qué compuestos de una base de datos se ensayarán experimentalmente en modelos *in vitro* y/o *in vivo*. Tales modelos o algoritmos se aplican a manera de filtro, y sólo aquellos compuestos de la base de datos que superen el filtro, es decir que superen un valor de *score* (puntuación) determinado para los modelos, se ensayarán experimentalmente (Reddy *et al.*, 2007; Talevi & Bruno-Blanch, 2009). En general las técnicas de rastreo virtual se clasifican en dos grupos dependiendo de si se enfocan en el receptor o en el ligando. Para la identificación de inhibidores del transportador de poliaminas TcPAT12 se comenzó con una búsqueda virtual basada en el ligando por

similitud estructural. Dicha técnica consiste en medir el grado de similitud entre una estructura de referencia y cada uno de los compuestos que integran una base de datos utilizando alguna definición cuantitativa de la similitud estructural (Bajorath, 2001). Se realizó una búsqueda basada en el ligando utilizando la molécula de referencia correspondiente y una base de datos (ZINC, <http://zinc.docking.org/>) compuesta por un total de 2924 drogas disponibles comercialmente y aprobadas por la FDA (en inglés, *Food and Drug Administration*), mediante el uso del programa LiSiCA v1.0 (*Ligand Similarity using Clique Algorithm*) (Lesnik *et al.*, 2015). Las similitudes se expresaron utilizando el coeficiente de Tanimoto (Bajusz *et al.*, 2015). El coeficiente de Tanimoto (S_T) se define como:

$$S_T = c / (a + b - c)$$

Donde a representa el número de tipos de subestructuras o características presentes en el compuesto A; b el número de tipos de subestructuras o características presentes en el compuesto B; y c el número de tipos de subestructuras o características que se encuentran en ambos compuestos. Por lo tanto, el valor del coeficiente de Tanimoto oscila entre 0 y 1, donde 0 representa máxima disimilitud (es decir ningún tipo de subestructura en común) y 1 representa máxima similitud (todos los tipos de subestructura en común).

Las estructuras resultantes se utilizaron para construir una matriz de similitud y un dendograma basado en el coeficiente de Tanimoto, usando el algoritmo “*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*” (UPGMA). Luego se llevó a cabo una búsqueda virtual basada en el receptor, también conocida como técnica de *docking* molecular. La misma es utilizada para explorar y predecir las posibles interacciones ligando-blanco molecular (Sousa *et al.*, 2006). Para esta segunda etapa, se prepararon los archivos PDBQT (*Protein Data Bank*, carga parcial (Q) y tipo de átomo (T)) de los ligandos seleccionados mediante el empleo del programa AutoDock Tools v1.5.6 (Morris & Huey, 2009). La estructura tridimensional de TcPAT12 (GenBank ID: AY526253; TriTryDB ID: TcCLB.504213.110) se obtuvo por modelado por homología usando como templado el transportador de aminoácidos de *E. coli* (AdiC; PDB ID: 3L1L; cerca del 30% de identidad de aminoácidos con TcPAT12) utilizando los servidores I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) y Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>). El modelo se refinó con el software Modeller v7 y el modelo de TcPAT12 previamente reportado (Fiser & Šali, 2003; Soysa *et al.*, 2013). La estructura obtenida se evaluó por el trazado de Ramachandran usando Chimera v1.8 (Lovell *et al.*, 2003; Pettersen *et al.*, 2004). De este modelo, los residuos Asn²⁴⁵, Tyr¹⁴⁸ y Tyr⁴⁰⁰ se tomaron como flexibles

usando AutoDock Tools 1.5.6. El archivo del parámetro de la grilla se generó con Autogrid 4.2.6 para rodear los residuos flexibles con una grilla de 40 puntos en cada dimensión, un espacio de 0,0375 nm, y centrado en la posición X=-2,794; Y=9,659 y Z=22,928. También se realizó un ensayo de *docking* usando una grilla que cubre al transportador en su totalidad (120 puntos en cada dimensión), sin definir los residuos flexibles. Luego se utilizó el programa AutoDock 4.2.6 para calcular las conformaciones de energía óptima para los ligandos interactuando con el sitio activo del TcPAT12, corriendo el algoritmo “*Lamarckian Genetic Algorithm*” 100 veces para cada ligando, con un tamaño poblacional de 300, y $2,7 \times 10^4$ como el número máximo de generaciones. Para cada ligando, se agruparon las conformaciones unidas y se tuvieron en cuenta dos criterios para la selección de la conformación de unión preferencial: (i) la conformación de energía libre de unión más baja de todas las poses y, (ii) de los grupos más representados. En la Figura 15 se muestra un diagrama del rastreo virtual aplicado en la búsqueda de posibles inhibidores del TcPAT12 como potenciales drogas antichagásicas.

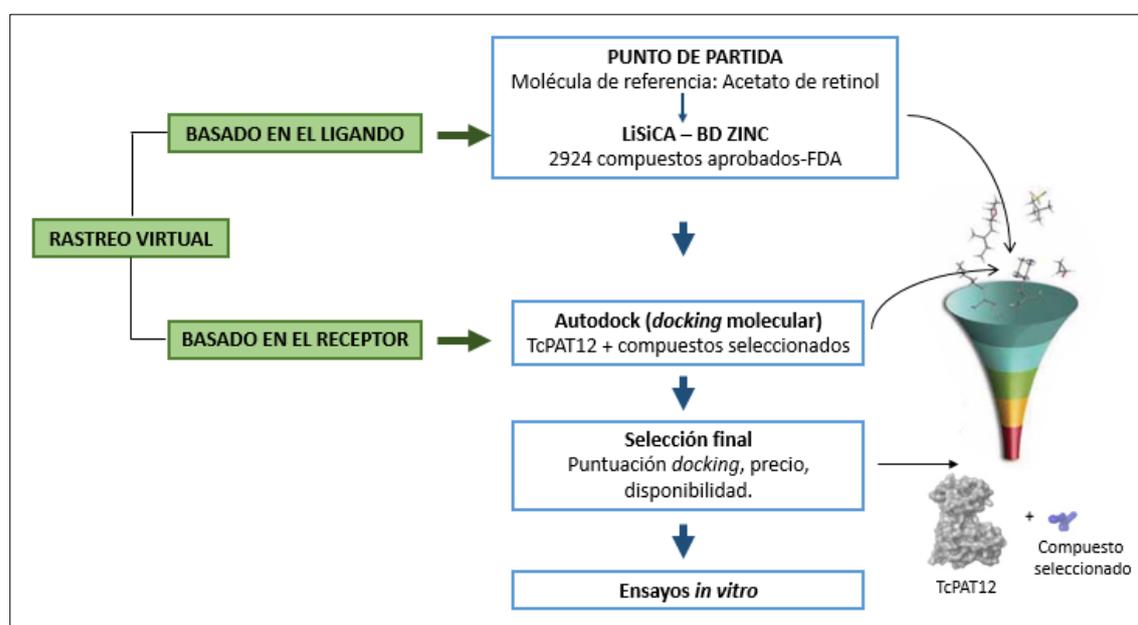


Figura 15. Estrategia de rastreo virtual. Se aplicaron 2 técnicas de rastreo virtual para la identificación de posibles drogas que interactúen con el sitio de reconocimiento de sustratos del TcPAT12. El rastreo virtual basado en el ligando se realizó utilizando acetato de retinol como molécula de referencia (ver resultados), una base de datos compuesta por un total de 2924 drogas aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*) y un algoritmo de búsqueda por similitud (LiSiCA). Los compuestos probados se obtuvieron de la base de datos ZINC. El segundo paso fue una estrategia basada en el receptor, usando la estructura tridimensional del transportador TcPAT12 como el receptor, y los compuestos seleccionados en el primer paso como posibles ligandos. El *docking* molecular se realizó con el software AutoDock.

Análisis estadístico

Se realizaron al menos 3 experimentos independientes para cada ensayo descrito y en cada uno se realizó por triplicado. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software Inc).

IV-Resultados

Capítulo 1. Estudio del transportador de poliaminas de *T. cruzi* TcPAT12

Como se mencionó en la sección de introducción, *T. cruzi* es auxótrofo para poliaminas, moléculas esenciales para la supervivencia del parásito, por lo que debe incorporarlas desde el medio externo por mecanismos de transporte. Hasta el momento, sólo un transportador de poliaminas fue identificado en el protozoo, denominado TcPAT12 o también TcPOT1. Nuestro laboratorio describió la funcionalidad del mismo como un transportador de alta afinidad para espermidina en un modelo de *X. laevis*, que también mostró una actividad de transporte para putrescina y arginina (Carrillo *et al.*, 2006). Luego Hasne *et al.* (2010) caracterizaron la misma proteína en epimastigotes de *T. cruzi* como una permeasa de alta afinidad para putrescina y cadaverina.

Considerando la participación de las poliaminas en procesos celulares fundamentales para *T. cruzi* como el crecimiento, la diferenciación y la protección contra el daño oxidativo, en esta primera parte de la tesis se continuó con el estudio del TcPAT12 abordando la relación entre la actividad del transportador, el crecimiento del parásito y la resistencia al estrés oxidativo y a drogas tripanocidas.

1.1 Análisis de la secuencia de TcPAT12

Con la publicación del genoma de *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005) se identificaron dos copias del *tcpat12* (*tcpot1.1*, ID: TcCLB.504213.110; y *tcpot1.2*, ID: TcCLB.506985.40) en base a su homología con la permeasa de poliaminas de *L. major* (LmPOT1). Puesto que la cepa de referencia que se utilizó en el proyecto de secuenciación del parásito, CL Brener, es un híbrido complejo de dos linajes evolutivos distintos (El-Sayed *et al.*, 2005; De Freitas *et al.*, 2006), TcPOT1.1 (613 aminoácidos) y TcPOT1.2 (627 aminoácidos) son alelos heterocigotos con un 98% de identidad nucleotídica, que se han asignado a los haplotipos Esmeraldo y no-Esmeraldo, respectivamente (Hasne *et al.*, 2010). Hasne *et al.* (2010) caracterizaron funcionalmente a TcPOT1.1 y TcPOT1.2 como dos permeasas de alta afinidad para putrescina y cadaverina. En este trabajo se estudió la copia TcPOT1.1 (de acá en adelante TcPAT12).

La proteína TcPAT12 es miembro de la superfamilia APC y dentro de este grupo, pertenece a la familia de transportadores de aminoácidos y derivados llamada AAAP. De acuerdo con la información disponible en la base de datos del *Conserved Domains Database* (CDD, NCBI) su estructura primaria

contiene dos dominios conservados de las permeasas de aminoácidos (COG0531, residuos 57-477; y pfam13520, residuos 53-449).

Un análisis *in silico* de la secuencia proteica del transportador utilizando el algoritmo TOPCONS predijo 12 posibles dominios transmembrana entre los aminoácidos 52 y 477, con los extremos N y C-terminales localizados en el lado citoplasmático.

Estudios previos de mutagénesis dirigida indican que los residuos Asn²⁴⁵, Tyr¹⁴⁸ y Tyr⁴⁰⁰ pueden interactuar directamente con putrescina en el bolsillo de unión del TcPAT12 (Soysa *et al.*, 2013). En la Figura 16 se muestra la topología de la permeasa donde se destacan dichos aminoácidos.

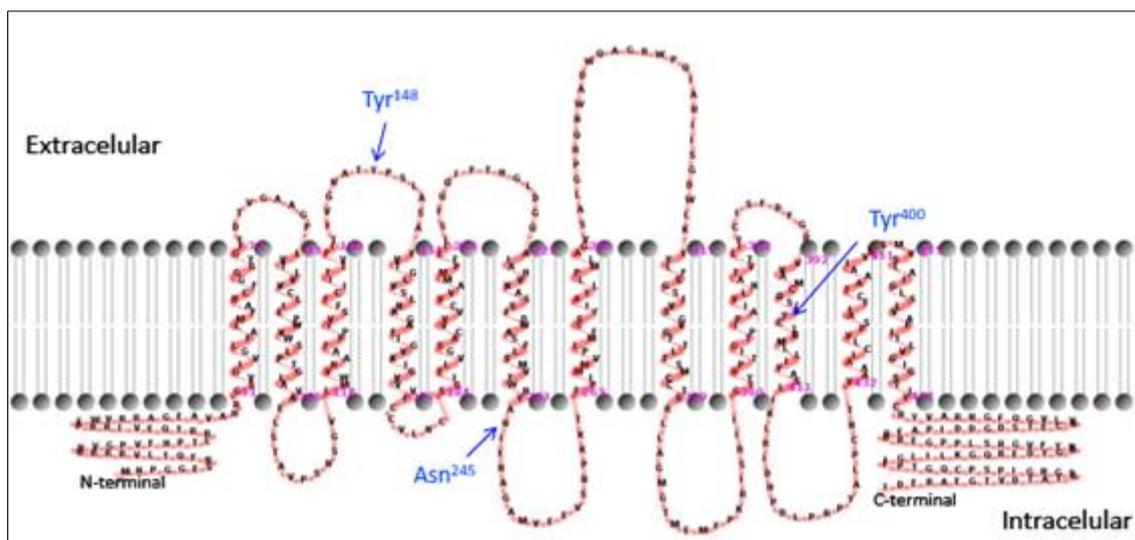


Figura 16. Topología del transportador TcPAT12. Resaltado en celeste se muestran los aminoácidos reportados como relevantes para el reconocimiento de putrescina.

En la Figura 17 se muestra un árbol filogenético de transportadores de aminoácidos y poliaminas de *T. cruzi* (mencionados en la sección de introducción), donde se observa que la proteína TcPAT12 forma parte de un *cluster* o grupo divergente de posibles transportadores de poliaminas (IDs: TcCLB.509551.20; TcCLB.506773.90 y su alelo TcCLB.508799.120; TcCLB.509167.40 y su alelo TcCLB.506831.20) estudiados más adelante en este capítulo.

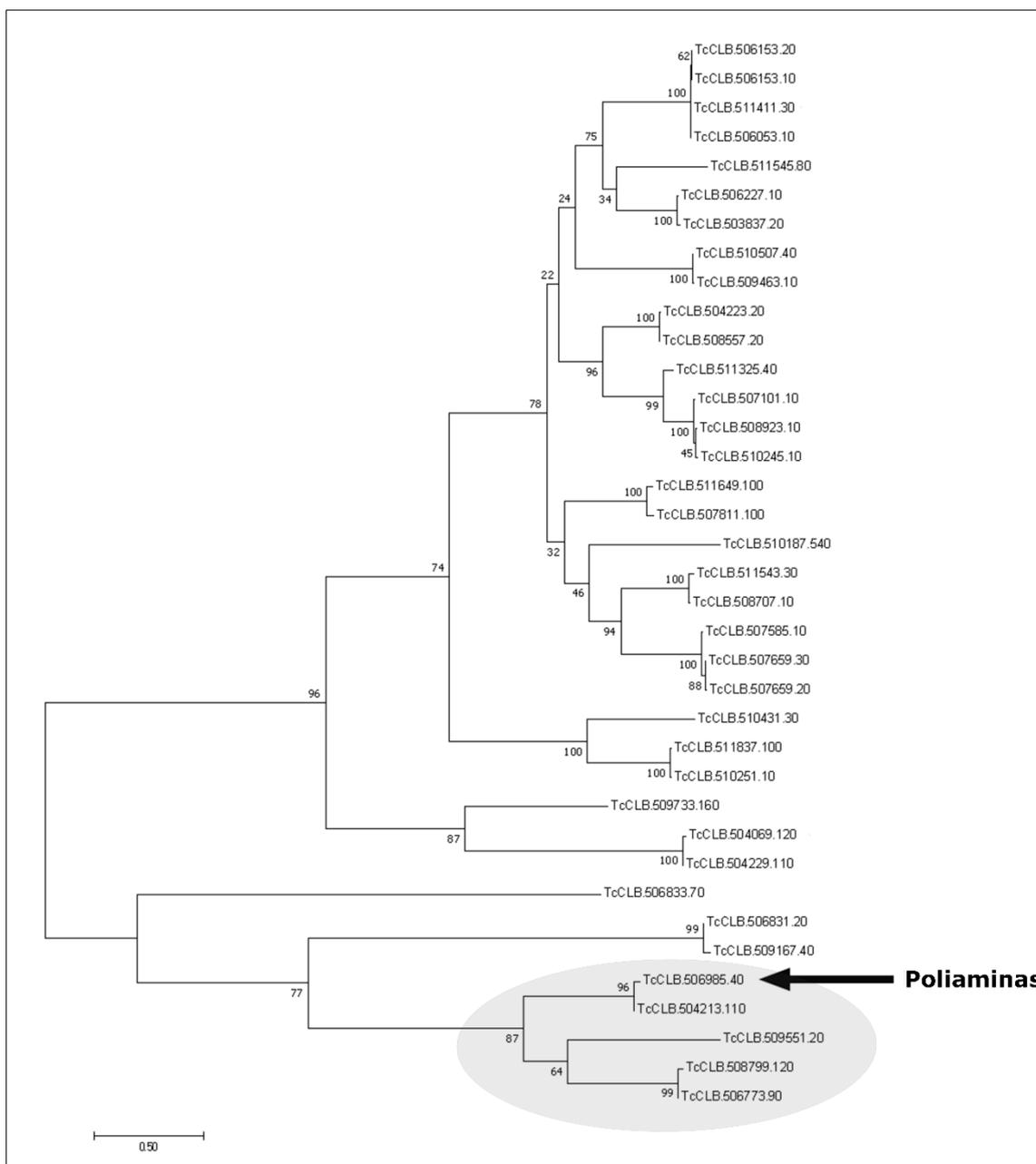


Figura 17. Árbol filogenético de transportadores de aminoácidos y poliaminas de *T. cruzi*. Las relaciones evolutivas de las proteínas se infirieron mediante el método de distancias *Maximum likelihood* basado en el modelo JTT (Jones *et al.*, 1992). El porcentaje de árboles en el que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. El árbol fue dibujado a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 37 secuencias de aminoácidos (Bouvier *et al.*, 2004). Los análisis evolutivos se realizaron utilizando el software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Se indican con una flecha las dos copias del transportador de poliaminas TcPAT12 (IDs: TcCLB506985.40; TcCLB504213.110). Resaltado en rosa se muestra el *cluster* de posibles transportadores de poliaminas incluyendo al TcPAT12.

Análisis de la sintenia de TcPAT12

Al comparar las secuencias de grandes fragmentos cromosómicos de las especies de tripanosomátidos de importancia sanitaria alcanzadas por el proyecto genoma, *T. brucei*, *T. cruzi* y

Leishmania spp., se pueden observar altos niveles de divergencia. Sin embargo, estos parásitos exhiben una conservación del orden génico llamativa, sugiriendo que la selección ha mantenido el orden de los genes entre los tripanosomátidos a lo largo de millones de años de evolución (Ghedini *et al.*, 2004). Un análisis comparativo de sintenia para cada una de estas especies sugirió que TcPAT12 de *T. cruzi* se encuentra prácticamente en el mismo entorno génico que el transportador de poliaminas LmPOT1 de *L. major*. En cuanto a *T. brucei*, si bien se mantuvo la sintenia del locus, el gen del transportador (ortólogo a TcPAT12 y LmPOT1) está ausente, siendo consistente con que el parásito se multiplica en el torrente sanguíneo donde los niveles de poliaminas no son suficientes para mantener su crecimiento, por lo que la disponibilidad de estas moléculas depende principalmente de la síntesis, lo que sugiere que el transportador podría haberse perdido en la evolución por falta de presión de selección. En contraste, *T. cruzi* y *Leishmania* se replican dentro de las células de mamíferos donde el contenido de poliaminas es notablemente mayor, y en el caso particular de *T. cruzi* el transporte es suficiente para cubrir los requerimientos para su supervivencia, sugiriendo que el parásito reemplazó, a lo largo de su evolución, dicha ruta metabólica por procesos de transporte (Ariyanayagam *et al.*, 1998; Phillips, 2018) (Figura 18).

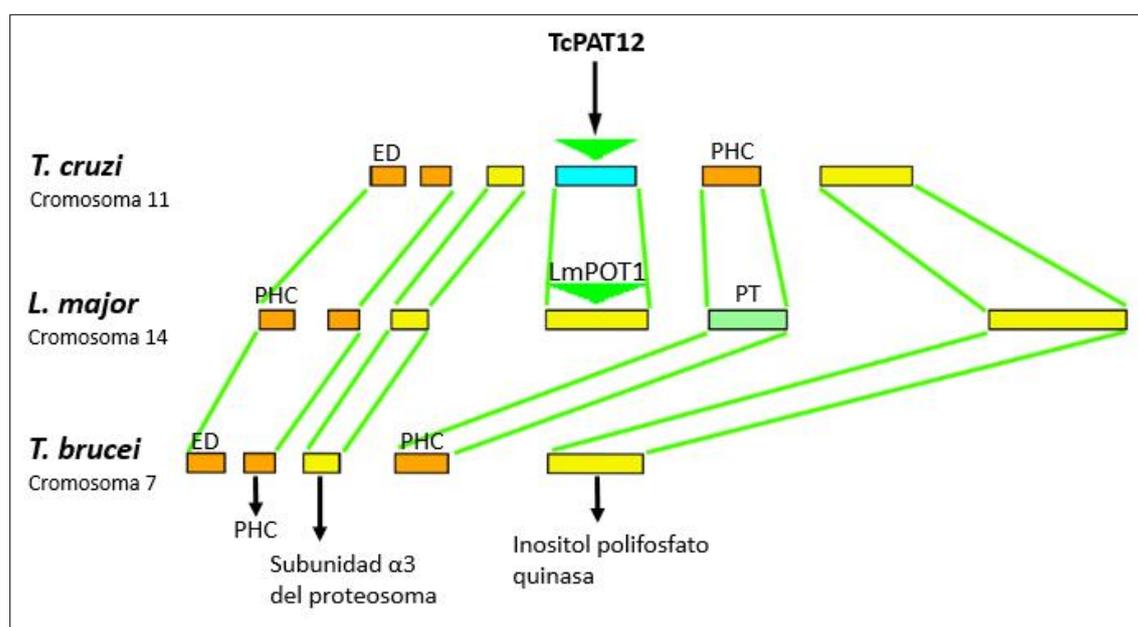


Figura 18. Análisis de sintenia. Esquema comparativo de la ubicación cromosómica del gen TcPAT12 (*T. cruzi*) y su homólogo LmPOT1 (*L. major*). Se indican las posibles identidades de los genes lindantes: ED, posible familia de epimerasa/deshidratasa NAD dependiente; PHC, proteína hipotética conservada; PT, posible proteína transportadora de aminoácidos de transmembrana; posible inositol polifosfato quinasa; posible subunidad α3 del proteosoma.

1.2 Caracterización de un modelo de epimastigotes de *T. cruzi* que sobre-expresan el TcPAT12

Como nuestro grupo identificó y determinó la especificidad del TcPAT12 en ovocitos de *X. laevis* (Carrillo *et al.*, 2006), en el presente trabajo se decidió continuar con la caracterización funcional del transportador en un modelo homólogo de *T. cruzi*, teniendo en cuenta su posible participación en el crecimiento de los parásitos y en respuestas a diferentes condiciones de estrés. Para ello, se generó un modelo transgénico de epimastigotes que expresan niveles elevados del TcPAT12. Parásitos sobre-expresando GFP fueron utilizados como control. La región codificante del transportador fue clonada en el vector de expresión para *T. cruzi* pTREX. Posteriormente se transfectaron epimastigotes de la cepa Y con los plásmidos pTREX-TcPAT12 (parásitos TcPAT12) y pTREX-GFP (parásitos GFP).

El modelo de sobre-expresión de TcPAT12 se validó por la técnica de RT-PCR semicuantitativa, en colaboración con la Dra. Carolina Carrillo y luego, mediante la actividad de la proteína por ensayos de transporte de poliaminas.

Para los ensayos de RT-PCR se utilizó como molde el ADN copia (ADNc) generado a partir del ARN aislado de los parásitos TcPAT12 y del control, y se amplificó con oligonucleótidos específicos para el transportador. Al normalizar los datos con ARNr 18S, los parásitos TcPAT12 presentaron un incremento de 2,3 veces más en el ADNc del transportador respecto al control (Figura 19). Una vez verificada la mayor abundancia del ARNm de la permeasa se procedió a evaluar el transporte de poliaminas.

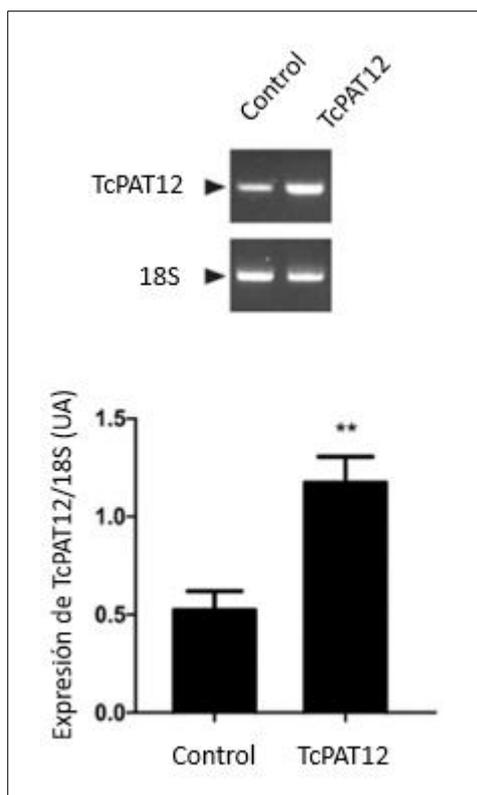


Figura 19. Validación del modelo de sobre-expresión de TcPAT12 por RT-PCR semicuantitativa. PCR con oligonucleótidos específicos para TcPAT12 y para ARNr 18S utilizando como molde ADNc obtenido de epimastigotes TcPAT12 y control. Los resultados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa (figura superior) y expresados como unidades arbitrarias (UA) (figura inferior).

Considerando los estudios previos acerca del TcPAT12 mencionados anteriormente (Carrillo *et al.*, 2006; Hasne *et al.*, 2010), se midió la incorporación de putrescina, espermidina y arginina en los epimastigotes transgénicos de *T. cruzi* a concentraciones saturantes (100 μ M) en un período de 10 minutos (Figura 20). A continuación se comparan las tasas de transporte de estos metabolitos entre los dos modelos de parásitos, cuyos valores corresponden al transporte máximo alcanzado en 10 minutos de ensayo (transporte, pmol/10 min) del gráfico de la Figura 20. Los parásitos TcPAT12 mostraron una tasa de transporte de putrescina de $4,32 (\pm 1,18)$ pmol/ (min. 10^7 células) y de espermidina de $2,49 (\pm 0,42)$ pmol/ (min. 10^7 células), mientras que para los parásitos control fue de $0,66 (\pm 0,05)$ y $0,76 (\pm 0,03)$ pmol/ (min. 10^7 células) para putrescina y espermidina, respectivamente. Es decir, que los parásitos TcPAT12 presentaron tasas de transporte para putrescina y espermidina de aproximadamente 7 y 3 veces mayores que el control ($p < 0,05$), respectivamente. En cambio, no se encontraron diferencias significativas en el transporte de arginina ($0,69 \pm 0,08$ pmol/ (min. 10^7 células) para TcPAT12 y $0,52 \pm 0,05$ pmol/ (min. 10^7 células) para GFP). Estos resultados indican que la proteína TcPAT12 es un transportador de putrescina y espermidina. Además, la misma carece de

la capacidad de transportar arginina a diferencia de como se había demostrado en ovocitos de *X. laevis* expresando TcPAT12 (Carrillo *et al.*, 2006).

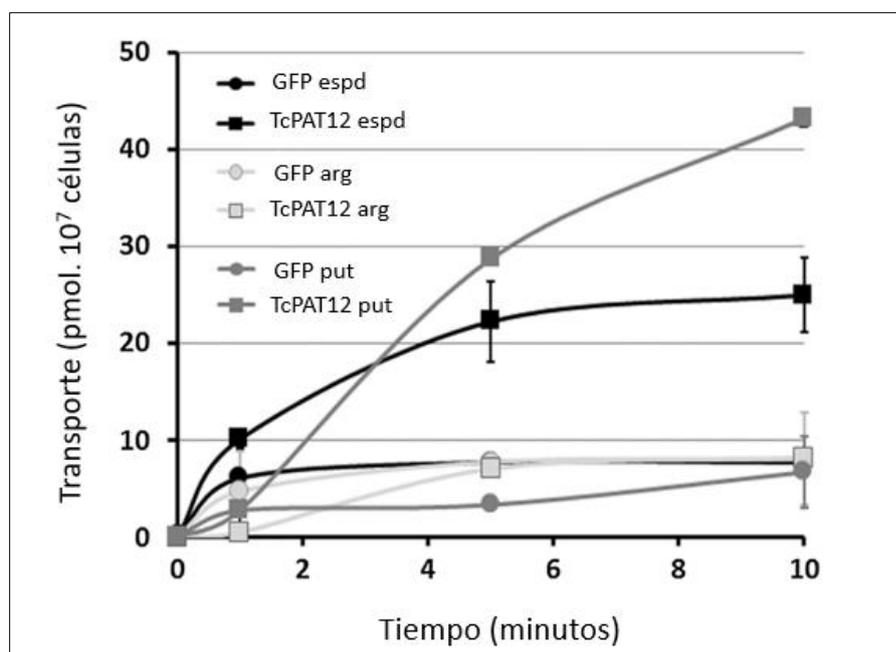


Figura 20. Transporte de poliaminas en epimastigotes transgénicos TcPAT12 y GFP de *T. cruzi*. Incorporación de espermidina (espd, línea oscura), arginina (arg, línea gris clara) y putrescina (put, línea gris oscura) en epimastigotes TcPAT12 (cuadrado) y controles GFP (círculo) en función del tiempo. Los parásitos (1×10^7) fueron incubados por 10 minutos con $100 \mu\text{M}$ de [^3H]-espermidina, arginina o putrescina.

Por otro lado, para estudiar las afinidades por ambos sustratos, putrescina y espermidina, entre los parásitos TcPAT12 y los parásitos GFP, se realizaron ensayos cinéticos del transporte de las poliaminas. Las tasas iniciales de transporte para las mismas fueron medidas como una función de concentración de sustrato en un rango de $0,5 - 400 \mu\text{M}$. Las constantes de Michaelis-Menten (K_m) estimadas para el transporte de putrescina y espermidina en los parásitos TcPAT12 fueron de $18,3 (\pm 3,2)$ y $30,3 \mu\text{M} (\pm 7,3)$, respectivamente. En cambio, los valores de K_m para el control fueron significativamente menores ($p < 0,05$), de $10,8 \mu\text{M} (\pm 1,3)$ para putrescina y $14,9 \mu\text{M} (\pm 4,9)$ para espermidina. Estos resultados se discuten en la siguiente sección.

1.3 Medición de poliaminas intracelulares

Con el objetivo de probar si el aumento en la velocidad del transporte se refleja en un aumento en la concentración intracelular de poliaminas, se evaluaron los niveles de espermidina y putrescina tanto en los parásitos transgénicos TcPAT12 como en los parásitos control GFP. La cuantificación de

poliaminas fue realizada por el grupo de trabajo dirigido por la Dra. Carolina Carrillo con el cual colaboramos en este tema.

Los parásitos fueron cultivados durante 3 días en medio semisintético SDM-79, que contiene bajos niveles de poliaminas aportados únicamente por los suplementos del suero fetal bovino, o con el agregado de 1 mM de putrescina. Posteriormente el contenido intracelular de las poliaminas fue determinado por HPLC.

Como se muestra en la Tabla 3 no se observaron diferencias significativas en el contenido de putrescina y espermidina intracelulares entre los epimastigotes transgénicos TcPAT12 y GFP incubados en el medio SDM-79. En cambio, con el agregado de 1 mM de putrescina, los niveles intracelulares de la misma aumentaron aproximadamente 3 veces en los parásitos TcPAT12 (14,4 nmol/10⁷ células) respecto al control (4,9 nmol/10⁷ células). En estas mismas condiciones también se observó un incremento del contenido de espermidina de 2,6 veces en los parásitos TcPAT12 (7,1 nmol/10⁷ células) respecto a los GFP (2,7 nmol/10⁷ células), por lo que al acumular más putrescina, *T. cruzi* puede interconvertirla en espermidina mediante la enzima espermidina sintasa del parásito.

Por lo tanto, estos resultados indican que los epimastigotes que sobre-expresan la permeasa de poliaminas tienen mayor capacidad de acumularlas dentro de la célula.

Parásitos <i>T. cruzi</i>	Putrescina nmol/10 ⁷ parásitos	Espermidina nmol/10 ⁷ parásitos
Control GFP	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,2
TcPAT12	1,4 ± 0,2 ^a	0,6 ± 0,1 ^c
Control GFP + 1mM putrescina	4,9 ± 1,1	2,7 ± 0,5
TcPAT12 + 1 mM putrescina	14,4 ± 1,8 ^b	7,1 ± 1,2 ^d

Tabla 3. Determinación de los niveles de poliaminas intracelulares en epimastigotes de *T. cruzi* sobre-expresando el TcPAT12 y la GFP. Los parásitos fueron cultivados en medio SDM-79 o suplementado con 1 mM de putrescina. Los extractos celulares fueron precipitados con ácido tricloroacético y tratados con cloruro de benzoilo. Los derivados se separaron por HPLC y se analizaron por espectrofotometría. Los datos están expresados como el promedio ± DS de tres réplicas independientes de cada ensayo. ^ap=0,0654 (comparado con el control); ^bp=0,0015 (comparado con el control con putrescina); ^cp=0,0808 (comparado con el control); ^dp=0,0042 (comparado con el control con putrescina), calculados usando el test-T.

Una vez validada la funcionalidad de los parásitos TcPAT12, se procedió a estudiar el rol de esta proteína en el crecimiento de *T. cruzi* y si está involucrada en la resistencia a diversas condiciones de estrés.

1.4 Efecto de la sobre-expresión del TcPAT12 en el crecimiento de los parásitos

Teniendo en cuenta que las poliaminas son importantes para la supervivencia y crecimiento de *T. cruzi* y que en este modelo transgénico los parásitos presentan mayor tasa de transporte y contenido intracelular de estas moléculas, se decidió evaluar si los mismos eran capaces de mantener su crecimiento de acuerdo a la disponibilidad extracelular de poliaminas. Para ello, se llevaron a cabo curvas prolongadas de crecimiento de los epimastigotes transgénicos que sobre-expresan el TcPAT12 y del control GFP en un medio con bajos niveles de poliaminas aportados únicamente por los suplementos del suero fetal bovino, o con altas concentraciones de putrescina (0,2mM). Como se muestra en la Figura 21 los parásitos GFP incubados durante 18 días en el medio SDM-79 con bajos niveles de poliaminas tuvieron una máxima tasa de crecimiento entre los día 1 y 10, seguida por una corta fase estacionaria y luego una fase de declinación (Figura 21 A). En cambio, en estas mismas condiciones los parásitos TcPAT12 tuvieron una fase de replicación muy corta entre los días 1 y 4 seguida por una fase estacionaria prolongada (Figura 21 A). Por otro lado, en el medio SDM-79 con el agregado por única vez al comienzo del ensayo de 0,2 mM de putrescina, ambos parásitos, TcPAT12 y GFP, presentaron una curva de crecimiento similar, con una fase de replicación mayor respecto a la primera condición de crecimiento (Figura 21 B). Como referencia se muestra en el *Anexo 1* una curva de crecimiento del control GFP en medio de cultivo rico BHT.

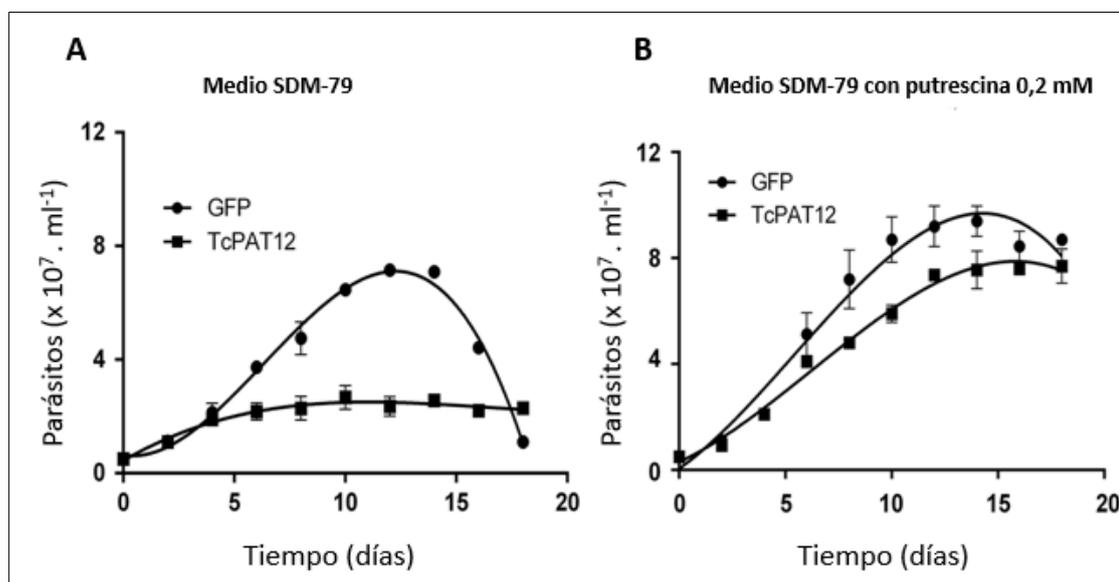


Figura 21. Curvas de crecimiento de parásitos TcPAT12 y GFP de *T. cruzi* en un medio de cultivo con bajas y altas concentraciones de poliaminas. Epimastigotes transgénicos ($0,5 \times 10^7$ /ml) TcPAT12 (cuadrado) y GFP (círculo) fueron cultivados en el medio semisintético SDM-79 con bajos niveles de poliaminas aportados por los suplementos del suero fetal bovino (A) o suplementado por única vez en el día cero con 0,2 mM de putrescina (B). Las células fueron contadas periódicamente durante 18 días.

Estos resultados indican que los epimastigotes transgénicos TcPAT12 tienen un crecimiento limitado en un medio de cultivo con bajas concentraciones de poliaminas debido probablemente a la sobre-expresión de la permeasa. Estas observaciones se discuten en la siguiente sección.

1.5 Sobre-expresión de TcPAT12 y resistencia a estrés

Las poliaminas son moléculas claves en la respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico en diferentes organismos (Alcazar & Tiburcio, 2014). Varios estudios han demostrado que estos metabolitos están involucrados en la resistencia a estrés en gran medida mediante la modulación de la homeostasis de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a sus roles directo o indirecto en la regulación de los sistemas antioxidantes (Liu *et al.*, 2015). Además, en tripanosomátidos el tripanotión, un conjugado de glutatión-espermidina, exclusivo de estos parásitos, es una de sus principales defensas contra el daño oxidativo (Fairlamb *et al.*, 1985; Fairlamb & Cerami., 1992). Por este motivo se estudió si el aumento en la incorporación de poliaminas y por lo tanto en sus concentraciones intracelulares debido a la sobre-expresión del gen TcPAT12 podría afectar la resistencia de los parásitos al estrés oxidativo. Para ello, los parásitos TcPAT12 y el control GFP fueron incubados con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (células TcPAT12, 0; 25; 50; 75; 100 y 150 μM ; células control, 0; 20; 25; 35; 45; 85 μM) durante 24 horas. Los parásitos TcPAT12 presentaron una resistencia a estrés oxidativo 6 veces mayor respecto al control, con valores de IC_{50} (concentración de H_2O_2 capaz de inhibir el 50% del crecimiento de los parásitos en cultivo) significativamente diferentes ($p=0,0064$), de 96,84 ($\pm 5,83$) y 16 ($\pm 0,68$) μM para los TcPAT12 y GFP, respectivamente.

Además del peróxido de hidrógeno, se evaluaron las resistencias a nifurtimox y benznidazol, un nitrofurano y un nitroimidazol, utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Ambas drogas generan radicales libres y peróxido de hidrógeno, pero únicamente el nifurtimox tiene un efecto tripanocida, al menos en parte, mediante la generación de estrés oxidativo (Maya *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2011; Hall & Wilkinson, 2012; Rajão *et al.*, 2014).

Los parásitos que sobre-expresan TcPAT12 y el control GFP fueron incubados con nifurtimox (TcPAT12, 0; 1; 5; 15; 30 y 80 μM ; control, 0; 0,5; 0,75; 1; 5; 15 μM) o benznidazol (TcPAT12 y control: 0; 10; 25; 50; 100 y 150 μM) durante 24 horas. En ambas condiciones, los parásitos que sobre-expresan la permeasa de poliaminas mostraron una resistencia significativamente mayor ($p=0,0001$) respecto al control GFP, en el caso del benznidazol la IC_{50} resultó ser 2,6 veces mayor para los

parásitos TcPAT12 y 46 veces mayor al ser tratados con nifurtimox. Los valores de IC₅₀ calculados para el benznidazol fueron de 16,91 ($\pm 1,24$) y 6,62 ($\pm 0,16$) μM y para el nifurtimox 5,07 ($\pm 0,93$) y 0,11 ($\pm 0,04$) μM en células TcPAT12 y GFP, respectivamente.

Las curvas de IC₅₀ de los tres tratamientos se presentan en el *Anexo 1*.

Los valores de IC₅₀ obtenidos para los diferentes tratamientos en los epimastigotes TcPAT12 y GFP se encuentran en la tabla 4.

Tratamiento	IC ₅₀ (μM)	
	TcPAT12	Control GFP
H ₂ O ₂	96,84 \pm 5,83	16,00 \pm 0,68
Nifurtimox	5,07 \pm 0,93	0,11 \pm 0,04
Benznidazol	16,91 \pm 1,24	6,62 \pm 0,16

Tabla 4. Efecto del peróxido de hidrógeno y de las drogas tripanocidas nifurtimox y benznidazol en epimastigotes que sobre-expresan TcPAT12 y parásitos control que sobre-expresan GFP. Alrededor de $1,3 \times 10^6$ parásitos $\cdot\text{ml}^{-1}$ fueron tratados con H₂O₂, nifurtimox o benznidazol por 24 horas. La viabilidad fue medida por recuento de células. Los valores de IC₅₀ están expresados en $\mu\text{M} \pm \text{ES}$ (error estándar).

En conjunto, estos resultados sugieren que las poliaminas son metabolitos fundamentales en los mecanismos de defensa del parásito ante diferentes condiciones adversas y además, que conectan al TcPAT12 con la resistencia al estrés oxidativo y a drogas tripanocidas.

1.6 Contenido de tioles en parásitos que sobre-expresan TcPAT12

Como los resultados obtenidos indican fuertemente que TcPAT12 está involucrado en la resistencia al estrés oxidativo, se decidió estudiar si participa en esta respuesta modulando la biosíntesis de tripanotión. Como se mencionó en el punto anterior, en tripanosomátidos, el principal sistema de detoxificación frente a diferentes especies reactivas de oxígeno está centrado en la molécula antioxidante tripanotión, un conjugado de glutatión-espermidina. Una hipótesis es que el aumento en la incorporación de poliaminas causado por la sobre-expresión de TcPAT12, produzca una mayor síntesis de tripanotión, y por consiguiente una mayor resistencia al estrés oxidativo. Para estudiar esta hipótesis se cuantificaron preliminarmente los tioles totales, incluido al tripanotión, de los parásitos TcPAT12 y GFP mediante la técnica de Ellman (Ellman, 1959), descrita en la sección de materiales y métodos. Los valores obtenidos para cada una de las líneas de parásitos fueron similares, 6,26 ($\pm 0,12$) nmol/10⁷ células para los parásitos TcPAT12 y 5,44 ($\pm 0,4$) nmol/10⁷ células para el

control. Esto indicaría en principio que la resistencia al estrés oxidativo mediada por TcPAT12 involucra otros mecanismos que no actúan directamente sobre el tripanotión.

1.7 Otros posibles transportadores de poliaminas

Como se mencionó anteriormente hasta el momento se identificó una sola permeasa de poliaminas en *T. cruzi* (TcPAT12). Sin embargo, otros sistemas de transporte de dichos metabolitos han sido reportados en epimastigotes, pero todavía no han sido identificados a nivel molecular (Le Quesne & Fairlamb, 1996; Hasne *et al.*, 2016). En el presente capítulo también se propone identificar nuevos transportadores de poliaminas que potencialmente podrían complementar la actividad de TcPAT12. La identificación de estas proteínas podrían tener, al igual que TcPAT12, una considerable importancia en la biología del parásito y a nivel terapéutico para el desarrollo de drogas, ya que le permiten al mismo superar su incapacidad de sintetizar poliaminas *de novo* y atacar selectivamente las infecciones por *T. cruzi* mediante la inhibición de esta función esencial de transporte.

1.7.1 Identificación de genes de posibles transportadores de poliaminas en tripanosomátidos

Con el objetivo de identificar otros transportadores de poliaminas en los genomas de los tripanosomátidos *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*, se realizó una búsqueda de secuencias de estos genes en la base de datos TriTryp (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>).

Usando los datos del genoma de *T. cruzi*, secuencias de aminoácidos correspondientes a bacterias, plantas y al transportador de poliaminas TcPAT12, se identificaron cinco posibles transportadores de dichos metabolitos. La Tabla 5 resume las características principales de los posibles transportadores de poliaminas de *T. cruzi* que se denominaron TcPT-2 al TcPT-6. Sus secuencias de aminoácidos presentaron un 20% de identidad y 46% de consenso. Las proteínas identificadas tienen entre 503 y 716 aminoácidos y una estructura predicha similar al TcPAT12, con 11 a 12 pasos transmembrana.

TcPT	Esmeraldo	No-Esmeraldo	AA	TMs	<i>T. brucei</i>	<i>L. major</i>
TcPAT12	TcCLB.504213.110	TcCLB.506985.40	613	12	-	+
TcPT-2	TcCLB.509551.20	-	521	12	+	+
TcPT-3	TcCLB.506773.90	TcCLB.508799.120	503	12	+	+
TcPT-4	-	TcCLB.506833.70	548	12	+	-
TcPT-5	TcCLB.509167.40	TcCLB.506831.20	716	12	-	-
TcPT-6	-	TcCLB.509733.160	594	11	+	-

Tabla 5: Genes de los posibles transportadores de poliaminas en el genoma de *T. cruzi*. Columna 1, nombre de los transportadores del parásito; columna 2 y 3, número de identificación de TriTryp de cada gen y su alelo (Esmeraldo y No-Esmeraldo); columna 4, número de aminoácidos de cada transportador (AA); columna 5, posibles pasos transmembrana (TMs) de cada proteína. Columna 6 y 7; presencia (+) o ausencia (-) de ortólogos en *T. brucei* y *L. major*.

Los resultados mostraron que todas las especies de tripanosomátidos analizadas en este trabajo presentan posibles genes de permeasas de poliaminas, además de los 6 genes en *T. cruzi* (incluyendo al TcPAT12), se encontraron 4 en *T. brucei* y 3 en *L. major*. Es interesante la identificación de estas proteínas en *T. brucei* y *L. major* ya que los mismos, a diferencia de *T. cruzi*, pueden sintetizar poliaminas *de novo*. Cabe mencionar que uno de los genes identificados en *L. major* corresponde al previamente caracterizado transportador de poliaminas LmPOT1.

Por otro lado se construyó un fenograma por el método de distancias *neighbor-joining* con las identidades aminoacídicas de los posibles transportadores identificados en este trabajo y de las permeasas de poliaminas TcPAT12 y LmPOT1, ya caracterizadas. La Figura 22 muestra la agrupación de los ortólogos en las tres especies de tripanosomátidos, *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*, en al menos seis grupos, y los más cercanos son los grupos conteniendo los transportadores PT-2 y PT-3.

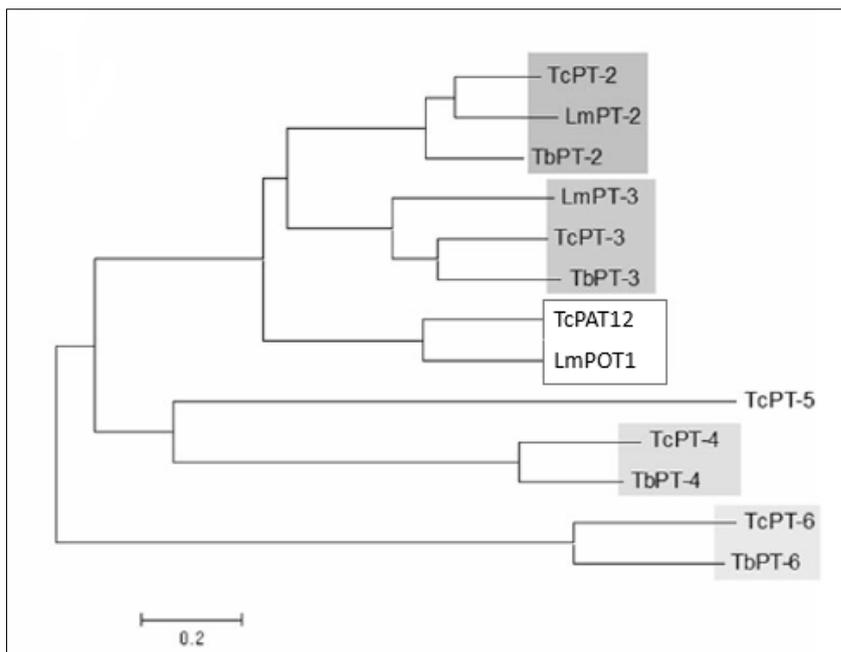


Figura 22. Fenograma realizado con las secuencias de los posibles transportadores de poliaminas de las tres especies de tripanosomátidos, *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*. En el recuadro blanco se ubican los transportadores de poliaminas, TcPAT12 y LmPOT1, ya caracterizados. Se pudo observar la presencia de al menos 6 grupos. Las relaciones evolutivas de las proteínas se infirieron mediante el método de distancias *neighbor-joining* utilizando el software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). El árbol fue dibujado a escala, con longitudes de ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético.

1.7.2 Análisis de las secuencias de TcPT-2/6

Se realizó un análisis más profundo en busca de motivos conservados en los genes TcPT mediante el uso del algoritmo bioinformático *Multiple Expectation maximization for Motif Elicitation* (MEME), como herramienta para encontrar en el futuro otros transportadores de poliaminas en *T. cruzi*. Se identificó al menos un motivo conservado en las secuencias de aminoácidos de los TcPT y en el TcPAT12, excepto en el TcPT-6 (Figura 23). El motivo identificado contiene 16 aminoácidos de longitud localizado en un dominio intracelular entre los pasos transmembrana 8 y 11 (Figura 24 A y Figura 25), sugiriendo que esta secuencia podría corresponder a un motivo funcional que evolutivamente se conservó en cada uno de estos genes. El gráfico logo de secuencias de la Figura 24 B muestra los residuos más frecuentes en cada posición del motivo, determinado por la altura de los mismos.

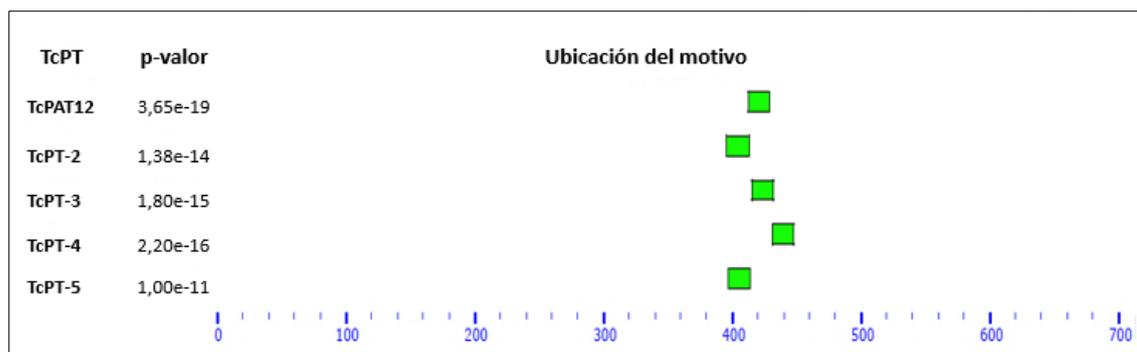


Figura 23. Diagrama de la ubicación del motivo conservado en los posibles transportadores de poliaminas de *T. cruzi*. El p-valor corresponde a la significancia estadística del motivo (menor valor p encontrado). El motivo se encontró en todos los genes excepto en el TcPT-6. El análisis se realizó con el software *Multiple Em for Motif Elicitation* (MEME) (Bailey *et al.*, 2006).

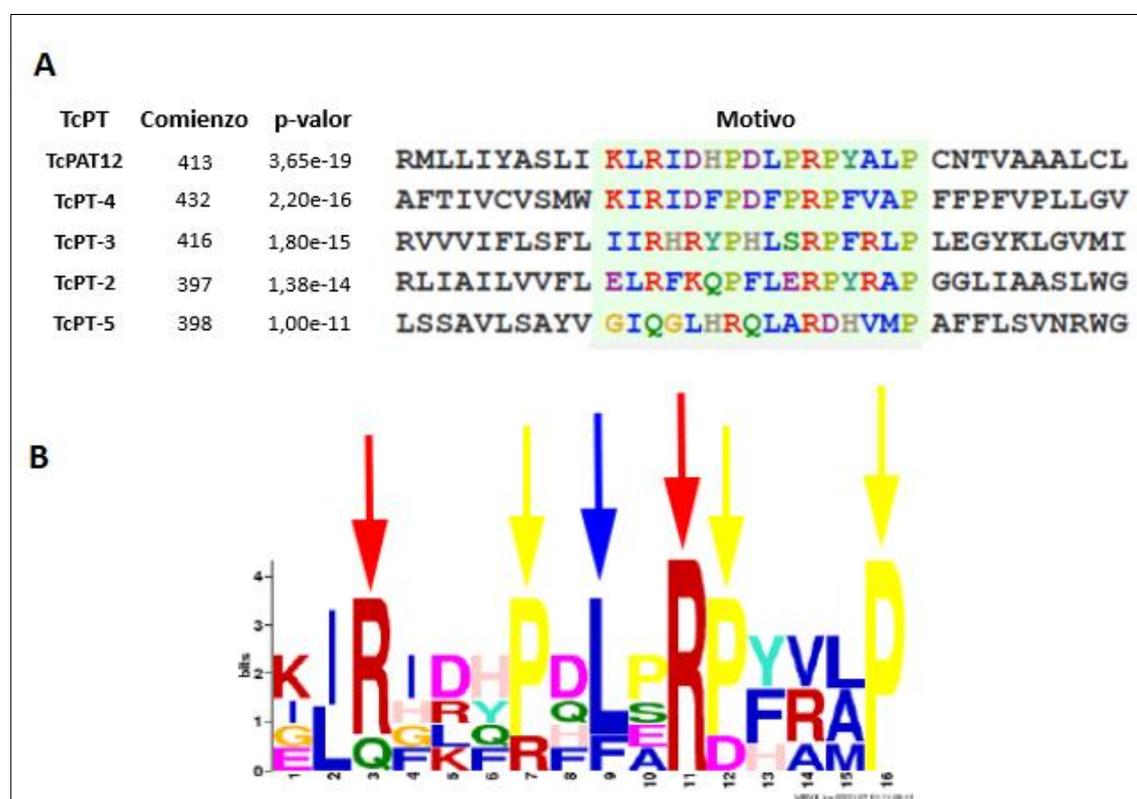


Figura 24. Representación gráfica de la principal secuencia motivo conservada en los posibles transportadores de *T. cruzi*. **A)** Alineamiento de secuencias múltiples del motivo. Columna 1, nombre de los transportadores del parásito; columna 2, comienzo de la secuencia del motivo; columna 3, p-valor correspondiente a la significancia estadística del motivo; columna 4, se resaltan las secuencias del motivo conservado en las proteínas analizadas. **B)** Gráfico de logo de los residuos más frecuentes en cada posición del motivo (flechas). La altura de los caracteres corresponde a la frecuencia de los residuos aminoácidos. El análisis se realizó con el algoritmo MEME.

En la Figura 25 se muestra el análisis comparativo de las secuencias correspondientes a las proteínas TcPAT12 y TcPT-2/6 mediante un alineamiento múltiple utilizando el algoritmo Clustal Omega. En el mismo se destacan las regiones transmembrana (TM1-TM12), el dominio conservado mencionado anteriormente, y los tres aminoácidos del sitio de unión a las poliaminas del TcPAT12

que contribuyen al reconocimiento de putrescina (Asn²⁴⁵, Tyr¹⁴⁸ y Tyr⁴⁰⁰), reportados en el trabajo de Soysa *et al.* (2013). Como puede notarse, las dos tirosinas se hallan conservadas en TcPT-2 y TcPT-3, que corresponderían a Tyr¹³⁴ - Tyr³⁸⁴ y; Tyr¹⁵⁰ - Tyr⁴⁰³, respectivamente. De estos dos aminoácidos del TcPAT12, se demostró que el residuo aromático Tyr¹⁴⁸ tiene un rol directo en el reconocimiento de putrescina, ya que una mutación de esta tirosina por alanina disminuyó la afinidad del transportador por la poliamina (aproximadamente 6 veces) mientras que una mutación por fenilalanina no tuvo un impacto significativo (Soysa *et al.*, 2013). La Asn²⁴⁵ se encuentra reemplazada en ambas proteínas TcPT-2 y 3 por una glicina (Gly²²⁹ en TcPT-2 y Gly²⁴⁸ en TcPT-3). Interesantemente, esta sustitución también se encuentra en los demás TcPT. La Tyr¹⁴⁸ se mantiene conservada en TcPT-6 (Tyr²⁸³), pero no así la Tyr⁴⁰⁰.

En síntesis, los resultados del análisis de las secuencias de los TcPT junto a la presencia de un motivo conservado sugieren que estas proteínas podrían ser transportadores de poliaminas, en especial TcPT-2 y 3 que forman parte de un mismo *cluster* donde se encuentra el TcPAT12 (árbol filogenético de la Figura 17 y 22). Sin embargo, estudios bioquímicos son necesarios para confirmar esta hipótesis.

TcPT-6	MASREEKSLFSDGAEVVAEKTPTFPRDVQQRMNVESPMWLQRESTRASVHEPHLPVSCA	60
TcPT-5	-----MTDDPASTVPLLNPDERA---MAYGLR-----GFEISRRPYKAATP	38
TcPT-4	-----	0
TcPAT12	-----	0
TcPT-2	-----	0
TcPT-3	-----	0
TcPT-6	SGLSTSSRWRSAAASLRSEDKQPTLSECSRTLTVPATHRLDAVNVAIVDSNPRTAMLQR	120
TcPT-5	EGCIPKQRWGSAPRGA-----VVYLNPGSGSFQD	67
TcPT-4	-----MD	2
TcPAT12	-----MSPGGESNFQ	10
TcPT-2	-----	0
TcPT-3	-----	0
TcPT-6	CGHQAAANYHTSLEFVSNVAVETKKVDAAYEDEDIDHSLGERLTDVLESSLRGAASVSQ	180
TcPT-5	VL--APSP-----RGSLLLY-----SKRELSSEETKVNQDVPVGP----	101
TcPT-4	VT--SKSESRLGTLFFRNLL--RRR-CIYATVA-----SLES-----	34
TcPAT12	TL--VRRRNHVGPVFH-PTL--RRTQEVIRRPEW-----VRRAGEA-----	46
TcPT-2	-----M--RGITQIEADPAD-TTRYLSPTVRFRI PDGESE-----	32
TcPT-3	-M--SERQYFEHPRWH-LLR--RNNAAVGGTTS DVPTGNLPSEQGTGVS DDEKK-----	48
	TM1	TM2
TcPT-6	RGEANNILGRAA-F-HIFKGNVAGVFLSTYYK DAGYGVGFLLVFL-----LGVLMIDC	233
TcPT-5	-GVKKPSLQQLRATAIAGNEIASCIY---ATGIVVSAA-GRLACFSSLLVSVVLYLFRW	156
TcPT-4	-SPFRRTLGLRSLVSLGVGAVVGAGIFVITGQAAAL-YA-GPAL-----AISFLLCVFPC	86
TcPAT12	-VAHRGSVGIVGLFALMFANCFGGG-Y---GFEDTVGAA-GPLV-----TL-VVCLILPW	94
TcPT-2	-SRPKTALTTLTLLGVYYTASISGG-Y---GLEESVSAG-GPLL-----TI-IFLCLIPF	80
TcPT-3	-NVPKRTLSSLMLLGIMYTYTISGA-Y---AIEETVMGG-GPLL-----TL-VVITLIPV	96
	: : : : *	: : :
	TM3	
TcPT-6	ALALVRSKQKIDLLIVRTYPAVVGHI-----LGSTLMHFTNFSLI FTQ-	276
TcPT-5	V-----YTEM--FGPQPTNGGTYNALRKAFDKNWASLAAAILSTLS-YVATAVTS---	202
TcPT-4	L--FTALCYGEL--AAMI PAAGSAYHTHTAVALGEFTSWIVAVGLTLECLVSGSAVSVSW	141
TcPAT12	VWSLPTGLAVAE--STAVPSNSGVLMWVNAAFPVYVFCIITTVFITFVGN-----	146
TcPT-2	LWGI PVSLCVAEL--SCAIPSNAGFIMWVNVSCASWTFCTVVIWTAFLNFVINS-----	132
TcPT-3	LMAMPTALVVAEL--ATAIPSNAGFLMWVSVSFHRVLYFSMVIQSLLLIFIDNA-----	148
	: : * : . : : : :	
TcPT-6	-----FGFCVVYIQYASSMFTALLSATQF-----YQLLVFLSVLVMVMPMSLF	318
TcPT-5	-----AASAGDYL-----QFQWNAMPSKSI SIGILIFFAVVNLFGMRE	240
TcPT-4	SSSVQSF LRF SIVFPF EFGGSPIGVSGNGFFLTGNLNFNPAVMLTLFCSVVLC LGVSE-	200
TcPAT12	-----IYPSLTSAYVTGIVSLNKG--AEVG-VKIGVIVFOCVLNCSGIEL-	188
TcPT-2	-----IYPTVLADYCATLLNLNFF--EKTL-IKVCF LGICAIINIVGVQV-	174
TcPT-3	-----LYPVLFSEYVCTTISCTIV--ANRG-FRAGMLFVTYILNLTGVRA-	190
	. . . : : :	
TcPT-6	SHNMRMLAYASMIAAVVALVLAGAVGEELDYLSTRGVSGT VFF EPTMRILV---FIS	374
TcPT-5	-----SSYVASL-----IFLLHLLILCVL---VLS	262
TcPT-4	-----TATVNNV-----FVIVK---FMVLGSAFFAN	222
TcPAT12	-----VGSACVV-----VCVAMMPFLILSFOQIF	213
TcPT-2	-----VGTLSVG-----VMLVTLFPFLMFLLO--	197
TcPT-3	-----VGMVSVM-----LTVATIVPFVLMFSMHLF	215
	. . : : :	
TcPT-6	GHMFSLEGIGVVLPEV-SM--A--AEDRPQFSTLVKYTLASIVTI--YVVFGLLGYLAF	427
TcPT-5	ALVYVCRDGGKVL RDSWNSPSLAANP-----YDQWITC-----IFFGYSSALLGATGFESS	313
TcPT-4	GVYFAV-----THWADFKFNLTFFVPPNNGELGKYGVSGILRGAGVFFANVGFDTI	274
TcPAT12	TH--G-----LDQAI----AHVNASSIDWASF-----LSMVTWNYANIENA	249
TcPT-2	-LPY-G-----FDWERI----GY-VPENINWSVF-----LPVVAWNFSGFDSA	233
TcPT-3	KNNF-Y-----LNWPAI----SF-IPANIDWSTF-----ISTASWNLCGLEQV	252
TcPT-6	TM8 GEALQTSVVLAIPPSTTRTMLQVLLGFS-----LIFSYPQFLPAIQLVDRALGISVHKE	482
TcPT-5	SNYIE---EQGEG--VYPKTLRNMWFLVTVINPTLMILAIGVIPIEVLRNADPSL----	364
TcPT-4	EASAQ---ECRNQQRDLPRGVIYTLIC-----SALYFLVTALATGMVKYTSINVD	322
TcPAT12	GAMVE---EVSNNPKTFFIMVPLMFSS-----YIAYLLPMLAGVVSALG-PHQNWA	296
TcPT-2	GNVIE---EVSNNPPTFIRALGLMISA-----LATYIPPIVGVASAEALAEPTFD	281
TcPT-3	ATVTE---EVKTPHRTIIRALVPLLGLC-----YLTYPPIITGSSSKK-GFPDIS	299
	: : .	

TcPT-6	TM9	PWNAYIVRAVLNIFFGALAASIGADT-INV FASFLGAFTGVHLMITMPVI-----1	532
TcPT-5		-----ALLAQIAVGDW-LKVI VVFDAAFSLSSAVLSAYV G--IQGLHRQL	406
TcPT-4		A---P-----VIMAL-REVGAPPFLRILVDIGTI-SGL-----SSVCFACHEFAMPRLV	365
TcPAT12	TM8	DWQAG-----RWPQIAYIIISGDW-LKY YLFAGSIVSGVGFLLTSMCC-----TSRLL	342
TcPT-2		EWING-----FWVKVGEAVGGYA-MAVVVTVGGVISTVGLMTLLAT-----TSRSL	327
TcPT-3		KWKTG-----YWSYVAVSVGGSP-LQVLLIMGSFFSAFGMMISSLCT-----TSQVI	345
		: . : : :	
		TM9 TM10	
TcPT-6		A-----LFTDRVLNCAQED-----AEISFCDYVN-----FFFTMPDTIVECR-----	569
TcPT-5		ARDHVME AFFLSVNRWGGSNHFI-----IVGFCLVSCSRLLLVDDMSLGGVCAVAFLS	460
TcPT-4		MALAK-----DGLLPVLSCVHPRLKTPVNATLFCGVAGALIGGLFPLEMLGEIISLGLTV	421
TcPAT12		AGMGTMEMFPKRISRIIGYYHPTIGTPIPAIVLNATVTLIFCVSFDGFDVAMQSLY Y C L	402
TcPT-2		AGMGTLNAPFYL-SGWSQYDPNYGTPINATLVNAVVICLLSVFFSFQTLVELDQILY Y C L	386
TcPT-3		AGVAYTEVFPFVNRILYQRNKRFQTYHWLTLINALITGLFSVFLDFGLLVKSDQVLY Y C L	405
		. . :	
		TM11	
TcPT-6		-----WYLY	573
TcPT-5		VLMLLCLSSLFLQYRRGRLRGNLMIHPFVLLALFLVITAGFVGNVIRAPRNAMYFAIYFF	520
TcPT-4		AFTIVCVSM KIRIDFPDF ----- PRPFVA PFPPVPLLGV-----TFNSLQM	464
TcPAT12		RMLLIYASL KLRIDHPDL ----- PRPYALP ENTVAAALCL-----VPSAIFC	445
TcPT-2		RLIAILVFL ELRFKQFFL ----- ERPYPAP GGLIAASLWG-----GVPIAFS	429
TcPT-3		RVVVIFLSFL IIRHRYPHL ----- SRPFRLP LEGYKLGVM-----FPLLL	447
		. . :	
		TM12	
TcPT-6		LFIAMLVW-----IGGT-----YYTF-----DSVFG-----	594
TcPT-5		IFLFVVSVIRLRVSLSRVLDLI-----PSS-----CHWA-----KERMGDIVA	559
TcPT-4		FFLPLVAW---RN-----YIV-----VVVISLSWYLFYGIHRSKLHTLDPSSWRGFVYT	510
TcPAT12		FAAAIVSS---MVS LAIGLSLVAFLILVIGISYLY-CRY-----VARNGFQGVIVQ	492
TcPT-2		VVLIVVSM---FGSVVFLGTVMVVGTMVISYVG-VRF-----FRPEGFAGELVE	476
TcPT-3		MALTVVAM---MEDTQKVTVNLVIGGTLVLSFIY-CFF-----IRKGEFFGRVVT	494
		. : :	*
		TM12	
TcPT-6		-----	594
TcPT-5		SMRHCPVVYFA--KHADINVLNKAIQYIVDNEDTHMVKVIHVMVGRSLPPTASSASLK-QY	616
TcPT-4		ESGTAPHSSK---EEGRME-----EACSLEL-----	533
TcPAT12		CEASDDDDVPA-EDDGEGPPLSRGVFYNDGYDERQG----ELILGIFPTGQCPSPIGNGS	547
TcPT-2		EYEDADMQTYGIVLEHESNEW-RKTHPNHTF-----IDCEVS-----	512
TcPT-3		ETVEEREGD-----	503

TcPT-6		-----	594
TcPT-5		GSERDVHKDKES--AESFLRLE-----DENELTMTRELEQSCAIIIDQLYPKLTIE	665
TcPT-4		--PMEMAGRRRTSFLSV-----	548
TcPAT12		GTATDVTIGEPEKTFSGGGFGRTSPTGMMSSFSAQREMTGLYDLPTNGNDDE-----	599
TcPT-2		---EDKSGQKHN-----	521
TcPT-3		-----	503

TcPT-6		-----	594
TcPT-5		LLFVLAPFTPRVFYEISTELNVPREIMFMGCRGDCFSQILDQFDGVRVINY	716
TcPT-4		-----	548
TcPAT12		-----KPA-----RPNGEGRGFTN-----	613
TcPT-2		-----	521
TcPT-3		-----	503

Figura 25. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de los TcPT y del TcPAT12. Los recuadros grises indican las regiones transmembrana predichas (TM1 a TM12). Se muestra recuadrado y resaltado en amarillo el motivo conservado. Resaltado en celeste se muestran los aminoácidos reportados como relevantes para la interacción con los sustratos del TcPAT12. Símbolos: “*”, residuos idénticos; “:”, sustituciones conservadas; “.”, sustituciones semiconservadas (débilmente similar). El alineamiento se construyó con el algoritmo Clustal Omega.

Capítulo 2. Búsqueda de drogas tripanocidas que inhiban el transporte de poliaminas de *T. cruzi*

La importancia de las poliaminas para la supervivencia de *T. cruzi* y la incapacidad del parásito de sintetizarlas *de novo*, cuyo transporte es la única vía de obtención de las mismas, hacen que el transporte de poliaminas sea un blanco interesante para la búsqueda de nuevas drogas tripanocidas. Por lo tanto, en esta parte de la tesis se propone descubrir nuevos agentes terapéuticos para combatir al *T. cruzi* a través de la búsqueda de inhibidores del transporte de poliaminas.

El reposicionamiento de fármacos implica encontrar nuevos usos terapéuticos para medicamentos existentes, incluyendo aquellos que se encuentran en el mercado, discontinuados y potenciales candidatos que fueron abandonados o que están en desarrollo (Allarakhia, 2013). La búsqueda de segundos usos médicos de drogas ya conocidas permite introducir tratamientos nuevos reduciendo considerablemente los tiempos y costos asociados al desarrollo de un medicamento novedoso (Ashburn & Thor, 2004). En la primera parte de este capítulo se describirán los resultados obtenidos sobre drogas que están aprobadas para su uso en humanos y reposicionadas para su posible aplicación en la enfermedad de Chagas.

2.1 Evaluación de la pentamidina en *T. cruzi*

La pentamidina (4,4'-[pentano-1,5-diilbis(oxi)] dibencenocarboximidamida) (Figura 26), una diamidina aromática, es una droga antiparasitaria de amplio espectro que ha sido usada por décadas contra la leishmaniasis visceral y cutánea, la fase temprana de la tripanosomiasis Africana producida por *T. b. gambiense* y algunos hongos como *Pneumocystis jirovecii* (Cushion & Walzer, 2009; Wilkinson & Kelly, 2009; Kaur & Rajput, 2014). Sin embargo, existe muy poca evidencia acerca de su efecto en *T. cruzi*. Por otra parte, estudios previos han sugerido que la pentamidina bloquea un transportador de poliaminas presente en *L. major* (Hasne & Ullman, 2005); en consecuencia también podría bloquear estos transportadores en *T. cruzi*. Por esta razón, en el presente capítulo se decidió evaluar la actividad tripanocida de la pentamidina y estudiar su efecto sobre el transporte de poliaminas en los diferentes estadios de *T. cruzi*. Estos estudios fueron realizados en colaboración con el Dr. Rodrigo López-Muñoz de la Universidad de Chile, por esta razón, si bien se comentarán todos los resultados obtenidos, sólo se mostrarán los gráficos de los ensayos relacionados con el transporte de poliaminas realizados en nuestro laboratorio.

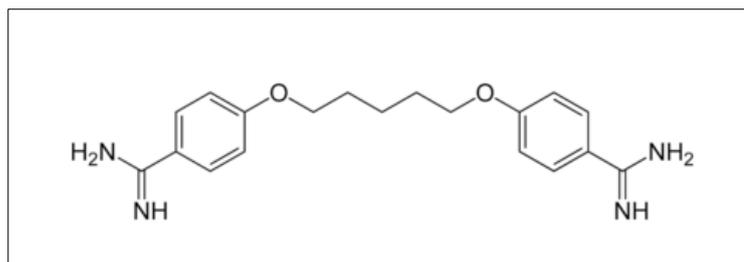


Figura 26. Estructura química de la pentamidina.

2.1.1 Efecto tripanocida

El estudio se comenzó evaluando la actividad de la pentamidina en tripomastigotes *wild type* de las cepas Y y Dm28c (UDTs TcII y TcI, respectivamente). Los parásitos fueron aislados y expuestos a distintas concentraciones de la misma por 24 horas y se comparó el efecto con el de las drogas tripanocidas nifurtimox y benznidazol. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo con el colorante vital MTT. La pentamidina fue activa contra los tripomastigotes con una efectividad mayor que benznidazol, pero menor que nifurtimox. Las IC₅₀ obtenidas para la acción tripanocida de las drogas se encuentran en la Tabla 6.

	IC ₅₀ (μM)	
	Y	Dm28c
Pentamidina	2,8 ± 0,7	15,2 ± 3,2
Nifurtimox	0,9 ± 0,7	3,4 ± 2,3
Benznidazol	3,8 ± 1,8	43,3 ± 21,3

Tabla 6. Efecto de la pentamidina sobre la viabilidad de tripomastigotes de *T. cruzi*. Tripomastigotes de las cepas Y y Dm28c fueron expuestos a la pentamidina, nifurtimox y benznidazol por 24 horas, y la viabilidad fue medida por el ensayo con MTT.

Para corroborar el efecto de la pentamidina sobre la viabilidad del parásito, se realizó otro análisis mediante la técnica de citometría de flujo, para seguir marcadores de muerte celular (ioduro de propidio y anexina-V) después de exponer a los tripomastigotes con la droga durante 24 horas. Para la cepa Y, 5 μM de pentamidina disminuyó la viabilidad celular a 18,2 % (±0,4). Por otro lado, de acuerdo con los experimentos de MTT, los parásitos de la cepa Dm28c fueron más resistentes a la pentamidina; 20 μM de la droga disminuyó la viabilidad de estos parásitos a 63,2 % (±4,0).

También se demostró que la pentamidina (1 μM) inhibió la carga parasitaria en células Vero infectadas con tripomastigotes de la cepa Y; y a concentraciones de 1,5 y 3 μM, la droga disminuyó

la liberación de tripomastigotes de las células infectadas en un 72,8 % y 95,5 %, respectivamente. En el mismo modelo, benznidazol (1,5 μM) y nifurtimox (1 μM), usados como controles positivos, disminuyeron la liberación de tripomastigotes en un 84,4 % y 90,9 %, respectivamente. Además, el tratamiento por 10 días con 8 mg/kg/día de pentamidina aumentó la media de supervivencia de ratones infectados con *T. cruzi* ($p=0,033$) con respecto a los controles, y disminuyó significativamente el pico de parasitemia característico para el día 14 post-infección. Asimismo, 8 mg/kg/día de pentamidina disminuyó la carga parasitaria en el tejido cardíaco de dichos ratones.

2.1.2 Efecto sobre el transporte de poliaminas

Resultados obtenidos en *L. major* indican que la droga inhibe el transportador de poliaminas, LmPOT1 (Hasne & Ullman, 2005). Esta proteína tiene un 55 % de similitud estructural con el TcPAT12, su ortólogo de *T. cruzi*, y presenta los tres residuos conservados críticos para el reconocimiento de putrescina (Asn²⁴⁵, Tyr¹⁴⁸ y Tyr⁴⁰⁰) (Carrillo *et al.*, 2006; Hasne *et al.*, 2010). Por consiguiente, se estudió un posible mecanismo de acción de la pentamidina evaluando si la droga afecta el transporte de poliaminas en *T. cruzi*. Cabe destacar que ampliar los conocimientos de los mecanismos de acción de drogas actualmente utilizadas como la pentamidina, permitirá identificar nuevos procesos involucrados en el surgimiento de resistencias que podría ser extensivo a otras drogas.

Se realizaron ensayos de transporte de poliaminas con concentraciones cercanas a los valores de K_m (5 μM para putrescina y 1 μM para espermidina) previamente reportados (Le Quesne & Fairlamb, 1996; Carrillo *et al.*, 2006), y en presencia de una dosis sub-lethal de pentamidina (un exceso molar de 10 veces respecto a los valores de afinidades de las poliaminas), en los estadios epimastigote y amastigote (proveniente de células de cultivo infectadas lisadas espontáneamente) de la cepa Y del parásito. Como se muestra en la Tabla 7, la droga inhibió significativamente el transporte de putrescina en aproximadamente un 85% en epimastigotes y un 81% en amastigotes. También hubo una inhibición significativa en el transporte de espermidina en un valor cercano a 40% en ambos estadios. Además, se determinó si la pentamidina inhibe inespecíficamente los procesos de transporte evaluando su efecto sobre la incorporación de aminoácidos no relacionados como el aspartato (32 μM) y la arginina (5 μM) en epimastigotes. En ambos casos no se observaron inhibiciones significativas.

Transporte de poliaminas (pmol/min. 10 ⁸ células)		
	Epimastigotes	Amastigotes
Putrescina	17,10 ± 0,97	3,34 ± 0,41
Putrescina + pentamidina	2,57 ± 0,41 ^a	0,62 ± 0,06 ^b
Espermidina	1,70 ± 0,15	1,95 ± 0,13
Espermidina + pentamidina	1,03 ± 0,12 ^c	1,19 ± 0,10 ^d
L-Arginina	1,12 ± 0,09	n.d.
L-Arginina + pentamidina	1,09 ± 0,11	n.d.
L-Aspartato	0,68 ± 0,14	n.d.
L-Aspartato + pentamidina	0,72 ± 0,12	n.d.

Tabla 7. Efecto de la pentamidina sobre el transporte de poliaminas en epimastigotes y amastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*. Transporte de [¹⁴C]-putrescina (5 μM), [³H]-espermidina (1 μM), [³H]-L-arginina (5 μM) y [³H]-L-aspartato (32 μM) fueron medidos en un lapso de 10 minutos en ausencia o presencia de pentamidina (un exceso de 10 veces respecto a las concentraciones de los sustratos), en los estadios epimastigote y amastigote. Las concentraciones de droga ensayadas no afectaron la viabilidad de los parásitos. n.d.: no determinado. ^ap<0,0001; ^bp=0,0004; ^cp=0,04; ^dp=0,001, comparados con el grupo control sin pentamidina, calculados usando el test-T.

Con el fin de profundizar el estudio del efecto de la pentamidina sobre el transporte de poliaminas en *T. cruzi*, se realizaron ensayos de dosis-respuesta. Se calcularon las IC₅₀ (concentración de la droga que inhibe el 50% del transporte) de pentamidina sobre el transporte de putrescina (5 μM) y espermidina (1 μM) en el estadio epimastigote, con valores de 25,6 μM y 14,1 μM, respectivamente (Figura 27 A y B). Estos resultados se compararon con diluciones isotópicas de las poliaminas usando las mismas concentraciones que la droga, representando la máxima inhibición que se puede lograr. Los valores de IC₅₀ obtenidos fueron de 6,1 μM y 2,6 μM para putrescina y espermidina, respectivamente (Figura 27 A y B).

Efectivamente la pentamidina inhibe el transporte de las poliaminas, putrescina y espermidina, en epimastigotes de *T. cruzi*, con una mayor inhibición de la incorporación de espermidina.

no fue capaz de inhibir completamente la incorporación de putrescina, sugiriendo que el parásito podría tener otros posibles transportadores de poliaminas como se plantea en el Capítulo 1.

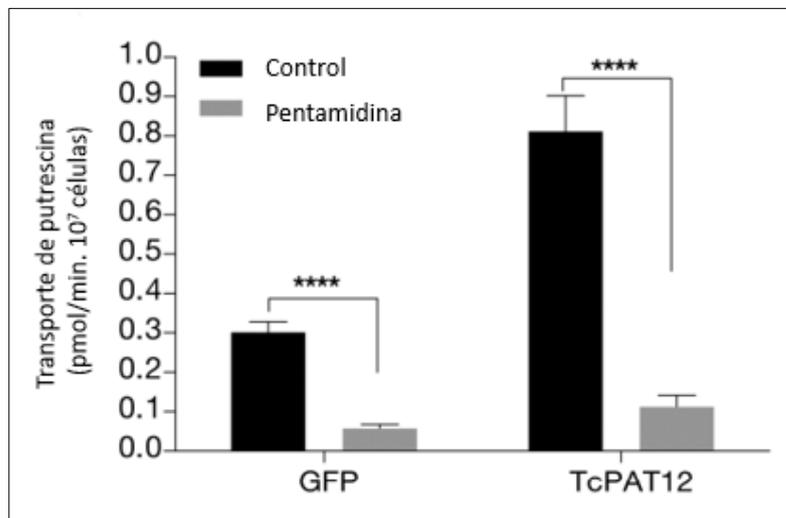


Figura 28. Efecto de la pentamidina sobre el transporte de putrescina en epimastigotes de *T. cruzi* que sobre-expresan el transportador de poliaminas TcPAT12 y la GFP. El transporte de [¹⁴C]-putrescina (5 μ M) fue medido a 10 minutos en ausencia (control) o presencia de pentamidina (50 μ M) en epimastigotes TcPAT12 y control GFP (1x10⁷). Esta concentración de droga no afectó la viabilidad de los parásitos. ****: $p < 0.0001$; comparado con sus respectivos controles sin pentamidina, calculado usando ANOVA de dos factores y test de Bonferroni.

En segunda instancia, para evaluar si la actividad tripanocida de la pentamidina está asociada a la inhibición del TcPAT12 se estudió el efecto de la droga sobre la viabilidad de los epimastigotes transgénicos. Se observó que la droga tuvo el mismo efecto sobre ambos modelos de parásitos, con valores de IC₅₀ de 33,5 μ M para las células TcPAT12 y 34,2 μ M para el control, determinadas a las 72 horas post-tratamiento (Figura 29). A pesar de la inhibición del transporte de putrescina, estos resultados sugieren que el TcPAT12 no es el principal blanco de la pentamidina.

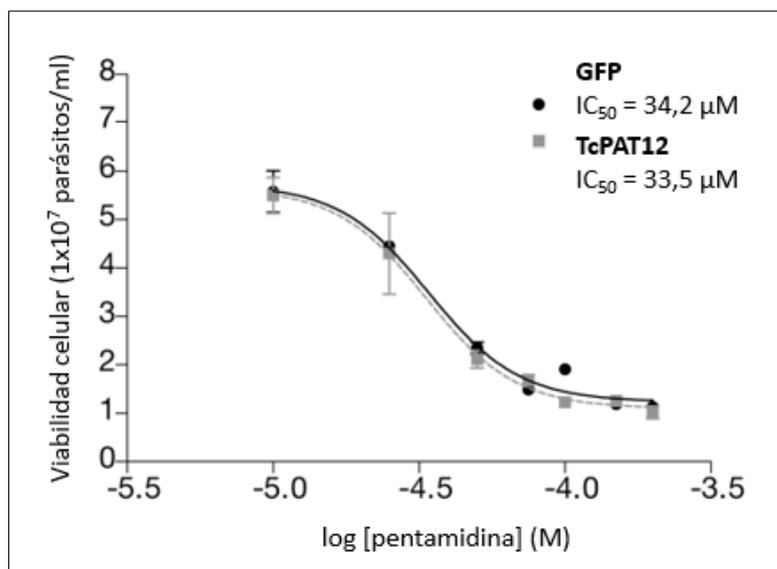


Figura 29. Efecto de la pentamidina sobre la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* que sobre-expresan el TcPAT12 y la GFP. Parásitos TcPAT12 y el control GFP (1×10^7 células/ml) fueron tratados con diferentes concentraciones de pentamidina en un rango de 0 a 200 μM . Las IC_{50} se determinaron a las 72 horas post-tratamiento y se calcularon mediante regresión no lineal usando el software GraphPad Prism v.6.

Considerando que la pentamidina inhibe el transporte de putrescina y espermidina en *T. cruzi* y que las mismas son precursoras en la biosíntesis del tripanotión, se planteó como hipótesis que esta inhibición produce una disminución de los niveles del compuesto glutatión-espermidina en el parásito. El grupo de investigación del Dr. Lopéz-Muñoz midió el contenido de tripanotión en epimastigotes *wild type* expuestos a la pentamidina (10 y 50 μM durante 6 horas). La droga no afectó los niveles del compuesto, incluso a concentraciones elevadas como 50 μM . Esta observación se discute en la siguiente sección.

En resumen, la pentamidina inhibe el transporte de poliaminas, pero no afecta los niveles intracelulares del tripanotión. Además, en parásitos que sobre-expresan el TcPAT12 la droga presenta la misma actividad tripanocida y el mismo efecto inhibitorio sobre el transporte de putrescina, independientemente de los niveles de expresión de la permeasa, sugiriendo que el TcPAT12 no es el principal blanco de la pentamidina.

2.2 Búsqueda de inhibidores del transportador de poliaminas TcPAT12 mediante reposicionamiento por rastreo virtual

En esta parte del trabajo se llevó a cabo una estrategia de reposicionamiento de fármacos mediante rastreo virtual (también conocido como *virtual screening* o tamizado virtual) con el objetivo

de identificar nuevos inhibidores del transportador de poliaminas de *T. cruzi* con potencial actividad tripanocida. Posteriormente, se evaluó por medio de ensayos *in vitro* la actividad inhibitoria de los compuestos seleccionados sobre el transporte de poliaminas y su potencial como agentes tripanocidas a fin de validar experimentalmente las predicciones del modelo computacional.

2.2.1 Estudios de rastreo virtual

El rastreo virtual se define como un conjunto de técnicas computacionales que permiten, a partir de representaciones de la estructura molecular de compuestos químicos almacenados en grandes bases de datos, identificar compuestos potencialmente interesantes desde el punto de vista farmacológico (Talevi & Bruno-Blanch, 2009).

Con el objetivo de identificar posibles inhibidores del TcPAT12, hasta ahora el único transportador de poliaminas de *T. cruzi* validado funcionalmente, se comenzó una búsqueda *in silico* de compuestos que tengan como blanco de unión la permeasa TcPAT12 entre drogas aprobadas utilizadas con otras indicaciones terapéuticas.

Primero se realizó una búsqueda bibliográfica sobre compuestos que alteren el transporte o la concentración intracelular de poliaminas en tripanosomátidos, donde se encontró que el butilhidroxianisol, el ácido retinoico y el acetato de retinol tienen efectos tóxicos en *Leishmania* spp., pero sólo el acetato de retinol actúa disminuyendo en un 50% los niveles intracelulares de poliaminas (Mukhopadhyay & Madhubala, 1994). Considerando estos datos, se seleccionó el acetato de retinol como molécula de referencia para realizar una búsqueda por similitud estructural de ligandos en una base de datos de 2924 drogas aprobadas por la FDA (incluidas en un *sub-set* de la base de datos ZINC). Esta metodología consiste en medir la similitud estructural de un compuesto de la base de datos con respecto al compuesto de referencia mediante el uso de un coeficiente que cuantifica el grado de similitud entre las estructuras comparadas (Talevi & Bruno-Blanch, 2009). De este rastreo virtual se seleccionaron 8 retinoides con mayor puntaje de similitud estructural, utilizando como criterio el coeficiente de Tanimoto (mencionado en la sección de materiales y métodos). En la Figura 30 se muestran los compuestos obtenidos por la primera etapa de la búsqueda virtual: acitretina (índice de identificación del ZINC, 3798734), alitretinoína (12661824), etretinato (3830820), isotretinoína (3792789), retinal (4228262), retinol (3831417), ácido retinoico (12358651) y acetato de retinol (26892410).

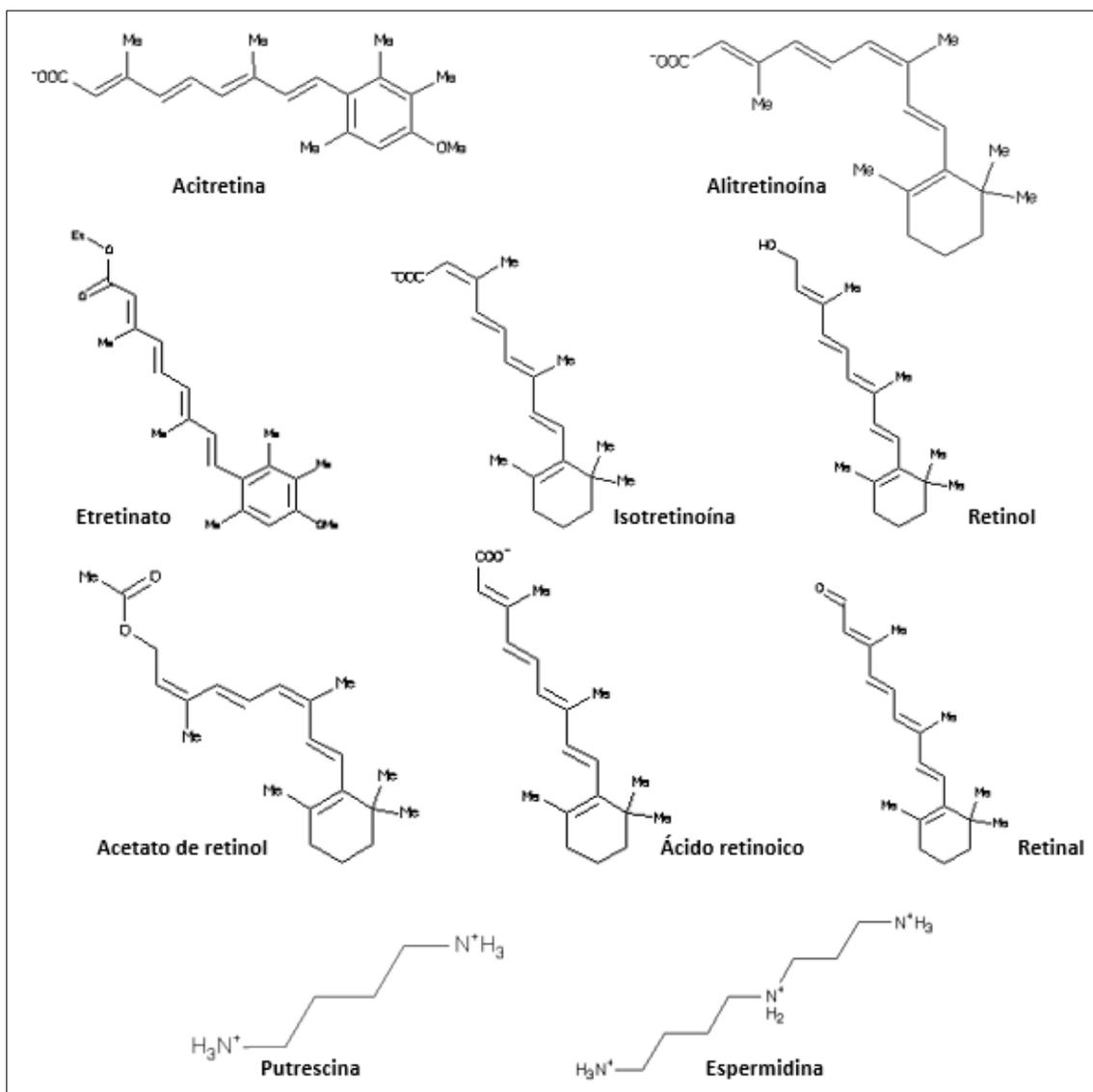


Figura 30. Estructuras químicas de los compuestos seleccionados a partir de una búsqueda virtual por similitud estructural de ligandos usando como molécula de referencia el acetato de retinol. También se muestran los sustratos del TcPAT12, putrescina y espermidina.

Para poder visualizar mejor las diferencias estructurales, los retinoides se usaron para construir un dendrograma a partir de una matriz de similitud basada en el coeficiente de Tanimoto (mostrada en el *Anexo 2*). El gráfico de similitud discrimina entre grupos conteniendo las diferentes generaciones de retinoides (indicadas como G1 y G2), las cuales no están estructuralmente relacionadas con los sustratos del TcPAT12, putrescina y espermidina (indicados como S) (Figura 31). Estas generaciones de retinoides de uso médico se diferencian en el período en que aparecen en el mercado farmacéutico y además, las estructuras de los compuestos de cada generación se parecen más entre sí que entre generaciones como se muestra en la Figura 30.

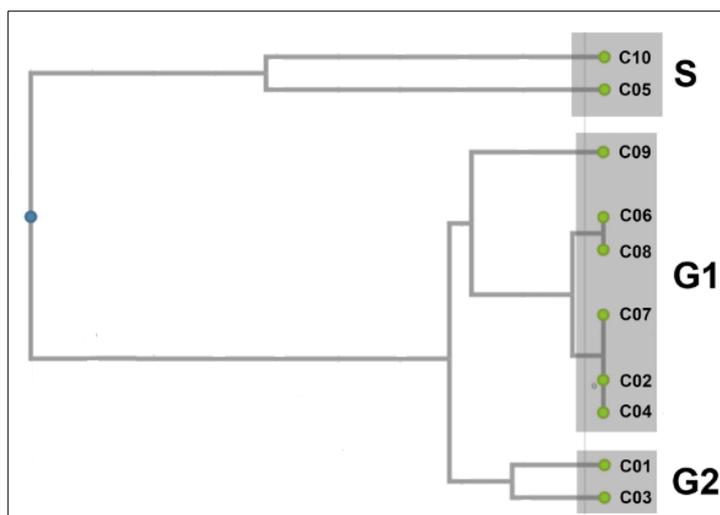


Figura 31. Dendrograma de similitud de los compuestos seleccionados. Los retinoides obtenidos del primer paso del rastreo virtual fueron utilizados para construir un dendrograma a partir de una matriz de similitud basada en el coeficiente de Tanimoto. G1 y G2 corresponden a las diferentes generaciones de retinoides, y S a los sustratos naturales de TcPAT12, putrescina y espermidina. Los números corresponden a los compuestos enumerados en la Tabla 8.

El segundo paso consistió en una estrategia de rastreo virtual basado en el receptor (también conocida como técnica de acoplamiento o *docking*). Esta técnica implica el *docking* de cada potencial ligando (los retinoides seleccionados en el primer rastreo virtual) al sitio de unión del blanco molecular (en este caso el TcPAT12), simulando eventos de reconocimiento molecular (Talevi & Bruno-Blanch, 2009). Para ello, se construyó un modelo tridimensional del transportador, dado que su estructura no se encuentra resuelta experimentalmente. La estructura del TcPAT12 se generó por modelado por homología, usando como templado principalmente la permeasa de arginina y agmatina (AdiC) de *E. coli*, que mostró cerca del 30% de identidad de secuencia. El modelo de TcPAT12 se logró por los servidores I-Tasser (Yang *et al.*, 2014) y Swiss-Model (Schwede *et al.*, 2003), y luego se refinó con datos validados experimentalmente, mediante mutagénesis dirigida sobre el sitio de reconocimiento de putrescina del transportador (Soysa *et al.*, 2013). Muchos métodos de evaluación para la calidad de los modelos de homología se basan en los datos disponibles en el Banco de Datos de Proteínas (PDB, *Protein Data Bank*). Sin embargo, es muy bajo el porcentaje de proteínas de membrana que están incluidas en este banco de datos por ser difíciles de cristalizar (Benkert *et al.*, 2011). Por esta razón, se evaluó la calidad del modelo de TcPAT12 mediante la comprobación de los ángulos de torsión de la estructura del péptido por el gráfico de Ramachandran, una de las herramientas sugeridas para tal fin (Rodríguez *et al.*, 1998; Lovell *et al.*, 2003). Los resultados mostraron que el modelo obtenido tiene solo 4,3% de las torsiones en las regiones no favorables del gráfico de Ramachandran, y ninguno de esos residuos está involucrado en el sitio activo predicho del

transportador (Figura 32). Dado que el 91% de las estructuras experimentales depositadas en el PDB tienen un 10% o menos de residuos en la región no favorable, y solo el 76,5% posee menos del 5% de aminoácidos fuera de las regiones favorables, se puede considerar que el modelo generado para TcPAT12 tiene una calidad razonable para ser utilizado en simulaciones de *docking* molecular (Kleywegt & Jones, 1996).

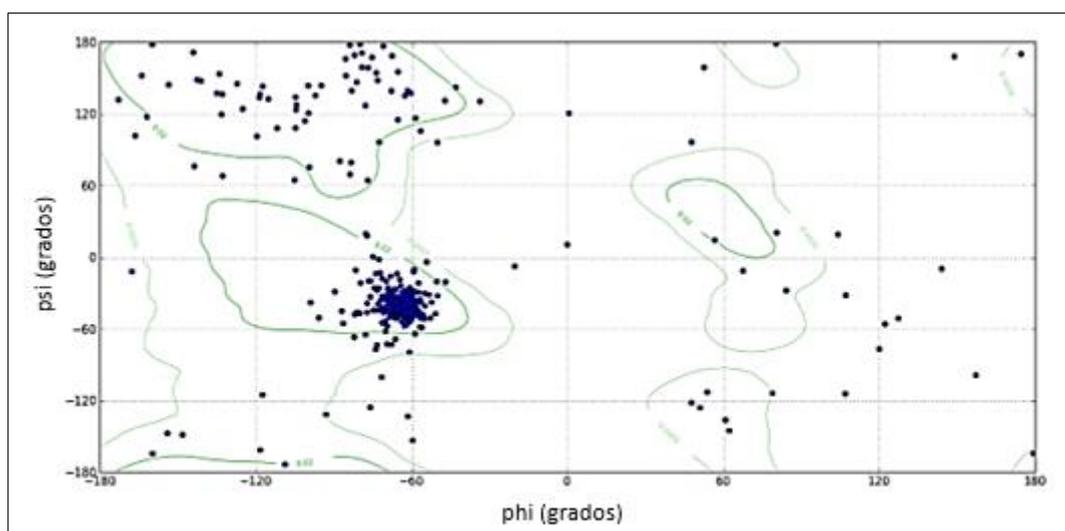


Figura 32. Evaluación del modelo de TcPAT12 por el gráfico de Ramachandran. Análisis de los ángulos ϕ y ψ de la cadena principal del péptido en un diagrama de Ramachandran para el modelado por homología del TcPAT12, con 86,5% de los residuos en la región permitida y 4,3% en la región no favorable.

Luego, se probó la capacidad de los retinoides seleccionados para interactuar con los residuos de unión al sustrato del TcPAT12 mediante una simulación asistida por computadora con el programa AutoDock 4.0, utilizando los sustratos naturales del transportador (putrescina y espermidina) como referencias de parámetros de unión y distintas grillas que determinan la región que se va a analizar. Se realizaron dos simulaciones de *docking*, una usando una grilla que cubre al transportador en su totalidad, y otra usando una grilla que abarca los residuos del sitio de unión del ligando, reportados en el trabajo de Soysa *et al.* (2013) (Asn²⁴⁵, Tyr¹⁴⁸ y Tyr⁴⁰⁰), y los adyacentes. En esta segunda simulación los tres aminoácidos se definieron como flexibles, es decir, se analizaron todas las torsiones posibles de los mismos. Finalmente se obtuvo una puntuación (*score*) asociada a la energía libre de interacción de cada potencial ligando al sitio activo del transportador de poliaminas. Para cada compuesto, se utilizaron dos criterios para analizar los resultados del *docking*: la conformación de energía libre de unión más baja de todas las poses (ΔG) y, la conformación de energía libre de unión más baja del grupo más representado (ΔG_{MPC}). En el primer criterio se evaluó la energía de unión del complejo TcPAT12-ligando para cada una de las poses previstas, es decir de las diferentes

disposiciones espaciales del ligando con el transportador en una determinada posición y se consideró la pose con el valor más bajo de energía libre de unión. Cuanto menor es esta energía, más estable será el complejo. En el segundo criterio, se tomó el menor valor de energía de interacción del grupo con mayor cantidad de poses, donde las interacciones ligando-transportador son muy parecidas (misma orientación general del ligando). Cuando los valores de energía libre de unión de ambos criterios coinciden mayor es la probabilidad de que esa pose sea la más estable.

Para el ensayo de *docking* donde la grilla se limita a los residuos flexibles, la isotretinoína tuvo los valores de energía de unión más bajos para ambos criterios de clasificación (Tabla 8). De acuerdo con estos modelos de *docking*, la isotretinoína se une dentro del canal hidrofóbico del transportador, en el bolsillo de unión a putrescina previamente reportado, interactuando con los residuos Asn²⁴⁵, Tyr¹⁴⁸ y Tyr⁴⁰⁰ del TcPAT12 (Figura 33 A y B). A su vez, este compuesto presentó una eficiencia de ligando (una función de puntuación del Autodock) de -0,37 kcal/mol por su interacción con el sitio de unión a poliaminas del TcPAT12, en cambio para putrescina se obtuvo una eficiencia menor de -0,52 kcal/mol. Además, el grupo con la energía libre de unión más baja ($\Delta G_{MPC} = -10,78$ kcal/mol) también fue el que mostró más conformaciones, con 35 de las 100 poses generadas. Interesantemente, cuando se realizó el acoplamiento de una simulación entre el TcPAT12 y la isotretinoína en toda la molécula transportadora, sin limitar la región a analizar, se obtuvieron resultados similares. La isotretinoína también se unió a los mismos residuos, Asn²⁴⁵, Tyr¹⁴⁸ y Tyr⁴⁰⁰. Ambos resultados sugieren que la isotretinoína se une más establemente en esa región del TcPAT12 que sus ligandos naturales, cuyas puntuaciones fueron mayores respecto a las del retinoide (putrescina, $\Delta G = -3,31$ kcal/mol y espermidina, $\Delta G = -3,08$ kcal/mol). Todos estos datos se resumen en la Tabla 8.

#	Compuesto (nombre genérico)	Compuesto (nombre comercial)	ΔG (kcal/mol)	ΔG (MPC) (kcal/mol)
C1	Acitretina	Neotigason®	-6,70	-6,70
C2	Alitretinoína	Panretin®	-9,56	-9,56
C3	Etretinato	Tegison®	+4,13	+4,13
C4	Isotretinoína	Roaccutan®	-10,78	-10,78
C5	Putrescina	-	-3,31	-3,31
C6	Retinal	-	-8,86	-8,86
C7	Ácido retinoico	Atralin®	-9,07	-9,07
C8	Retinol	-	-8,69	-8,69
C9	Acetato de retinol	-	-10,02	-9,23
C10	Espermidina	-	-3,08	-3,08

Tabla 8. Compuestos obtenidos por rastreo virtual basado en el ligando y análisis del *docking* molecular. Las columnas indican la abreviación de cada compuesto (#), el nombre genérico y nombre comercial, la eficiencia de ligando más baja (ΔG) y la eficiencia de ligando más baja del grupo mayoritario (ΔG , MPC, *most populated cluster*).

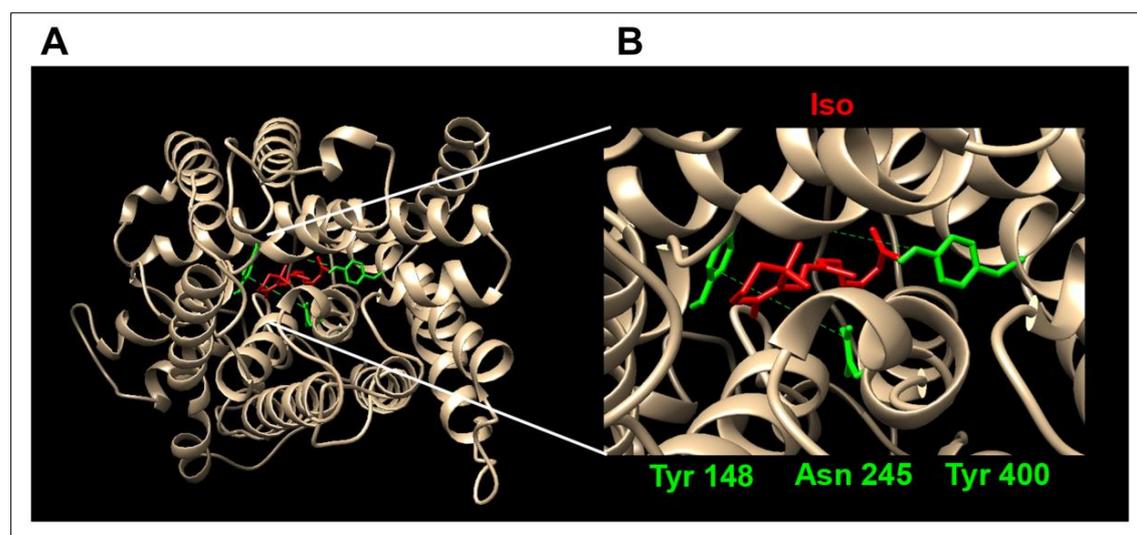


Figura 33. Predicción de la unión de la isotretinoína con el transportador de poliaminas TcPAT12. **A)** El modelo tridimensional de TcPAT12 (*GenBank* ID: AY526253) se obtuvo por modelado por homología en el servidor Swiss-Model (Schwede *et al.*, 2003) usando como templado la permeasa de aminoácidos de *E. coli* (PDB ID: 3L1L) y refinado utilizando una estructura modelada, previamente reportada (Soysa *et al.*, 2013). Los residuos tomados como flexibles para el análisis de *docking* están resaltados en verde, y el ligando isotretinoína en rojo. **B)** Detalle de la interacción de la isotretinoína (Iso, en rojo) con los residuos donde el sustrato putrescina se une al TcPAT12 (en verde).

La isotretinoína (ácido 13-*cis*-retinoico) es un retinoide derivado de la vitamina A (retinol) y se utiliza actualmente para el tratamiento del acné. Sus efectos secundarios más comunes son xerosis cutánea (sequedad de la piel), queilitis (escamación en la piel), caída del cabello, inflamación

constante del tracto digestivo y mialgia (Melnik, 2017). Su estructura química se muestra en la Figura 30.

Los resultados obtenidos mediante el rastreo virtual, junto con la disponibilidad de la isotretinoína en el mercado farmacéutico y a un precio accesible, permitieron considerarla como el mejor candidato para un análisis posterior. Con el objetivo de validar experimentalmente las predicciones del modelo computacional, se evaluó mediante ensayos *in vitro* la actividad inhibitoria de la isotretinoína sobre el transporte de poliaminas y sobre el crecimiento del *T. cruzi*, que se desarrollan a continuación.

En la Figura 34 se muestra un esquema general de la estrategia de rastreo virtual aplicada en este trabajo para seleccionar potenciales drogas tripanocidas.

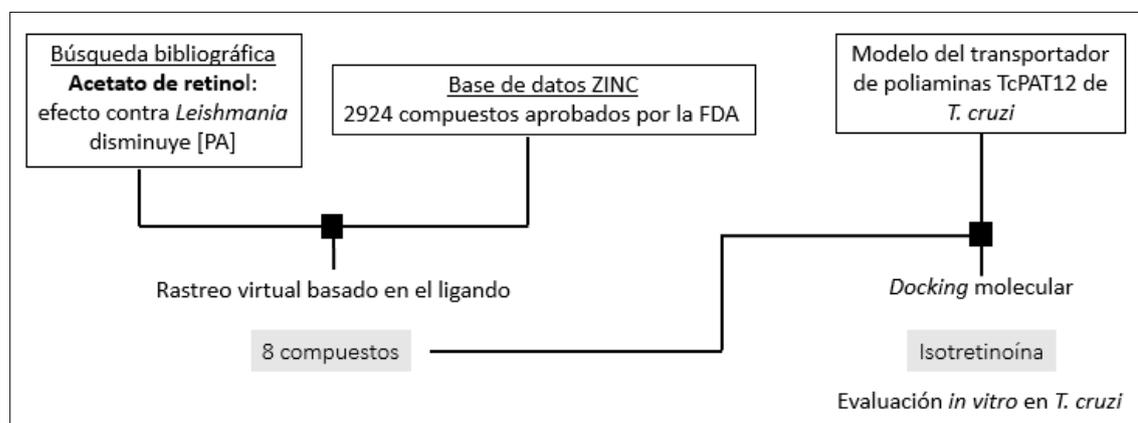


Figura 34. Esquema de la estrategia de rastreo virtual aplicada en el descubrimiento de drogas tripanocidas. Para la identificación de posibles drogas que interactúen con el sitio de reconocimiento de sustratos del TcPAT12 se aplicaron 2 técnicas de rastreo virtual basados en el ligando y en el receptor (*docking* molecular). La isotretinoína seleccionada por el rastreo virtual fue evaluada experimentalmente en *T. cruzi*. FDA, *Food and Drug Administration*; [PA], concentración de poliaminas.

2.2.2 Efecto de la isotretinoína y otros retinoides en el transporte de poliaminas

Se estudió la capacidad de la isotretinoína de inhibir el transporte de putrescina en epimastigotes *wild type* de la cepa Y de *T. cruzi*. La concentración de putrescina se fijó en 100 μM , aproximadamente 10 veces su valor de K_m (Capítulo 1). Antes de iniciar la reacción de transporte, los parásitos se preincubaron durante 15 minutos con distintas concentraciones de la droga, en un rango de 0 a 100 μM . Estas concentraciones no afectaron la viabilidad de los parásitos. Luego, los mismos fueron ensayados para el transporte de putrescina durante 10 minutos. Los resultados que se muestran en la Figura 35 confirmaron que aún a bajas concentraciones de la isotretinoína se produce una

inhibición significativa del transporte de putrescina. La concentración del fármaco calculada que inhibió el 50% del transporte fue de $4,6 (\pm 0,28) \mu\text{M}$.

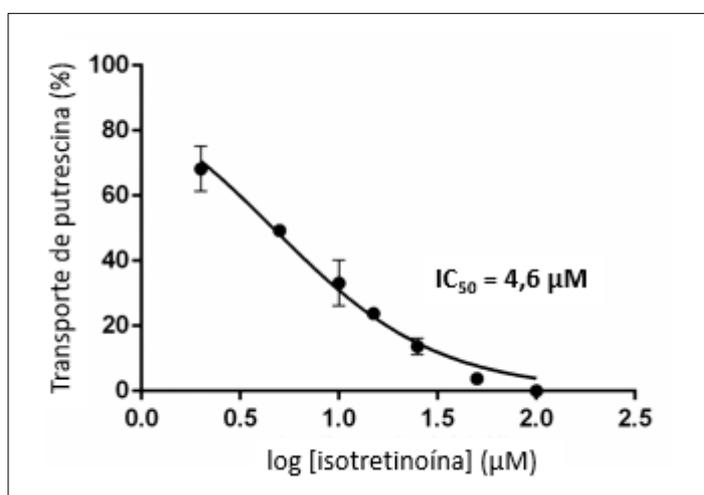


Figura 35. Efecto inhibitorio de la isotretinoína sobre el transporte de putrescina en *T. cruzi*. El transporte de la poliamina se midió usando cultivos de epimastigotes (1×10^7) y $100 \mu\text{M}$ de $[^3\text{H}]$ -putrescina, en presencia de la isotretinoína (0-100 μM) por un periodo de tiempo de 10 minutos. Los valores de transporte se dan como el porcentaje de la tasa de transporte respecto de los parásitos no tratados (11,7 pmol/min). El valor de IC_{50} se calculó mediante regresión no lineal usando el software GraphPad Prism v.6.

Además, se evaluó si el transporte de putrescina puede ser inhibido por otros retinoides obtenidos de los ensayos de *docking*, con valores de puntuación prometedores. Los ensayos fueron repetidos con la acitretina ($\Delta G = -6,70 \text{ kcal/mol}$), un fármaco utilizado para el tratamiento de la psoriasis, y con el precursor de la isotretinoína, el retinol ($\Delta G = -8,69 \text{ kcal/mol}$). Solamente en las condiciones probadas la acitretina inhibió significativamente el transporte de putrescina con un valor de IC_{50} de $6,8 (\pm 0,56) \mu\text{M}$.

2.2.3 Efecto de la isotretinoína en otros sistemas de transporte

Los transportadores de aminoácidos y poliaminas de la familia TcAAAP de *T. cruzi*, incluyendo al TcPAT12, son similares en términos de secuencias de aminoácidos, en particular en la región central comprendida entre el primer y último paso transmembrana (Bouvier *et al.*, 2004). Por este motivo, se estudió el posible efecto de la isotretinoína sobre otros transportadores de la misma familia. Los valores de IC_{50} se calcularon con los mismos criterios usados para el transporte de putrescina; aproximadamente 10 veces el valor de la K_m de cada sustrato, en presencia de la droga en un rango de 0 a $50 \mu\text{M}$. Los sustratos ensayados fueron prolina, lisina y una mezcla de aminoácidos (Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr y Val). Además, como control se evaluó el efecto

de la isotretinoína sobre la incorporación de timidina y glucosa, debido a que ambos compuestos son sustratos de permeasas no relacionadas con la familia TcAAAP. La droga inhibió significativamente el transporte de prolina, lisina y de la mezcla de aminoácidos, con valores de IC₅₀ de 10,3 (± 2,01); 5,1 (± 0,68) y 5,8 (± 1,04) μM, respectivamente. Por otro lado, la isotretinoína no produjo una inhibición significativa sobre la incorporación de timidina y glucosa. Estos resultados sugieren la especificidad de la droga por los miembros de la familia TcAAAP del parásito.

2.2.4 Evaluación de la isotretinoína sobre la membrana plasmática del parásito

Si bien los resultados anteriores dan un indicio de que la isotretinoína actúa sobre los transportadores de la familia TcAAAP, se decidió estudiar el efecto de la droga sobre la membrana plasmática del parásito debido a que en trabajos previos reportaron que este retinoide tiene afinidad por los lípidos (Ganceviciene & Zouboulis, 2010), por lo que podría provocar una desorganización de la membrana que tendría como consecuencia el aumento de la permeabilidad de la misma. Por esta razón se evaluó esta hipótesis mediante ensayos de permeabilización usando la droga, seguidos de un análisis por *Western blot*. Como control positivo se utilizó el detergente digitonina, que es un compuesto esteroideo que forma un complejo con el colesterol de la membrana plasmática, permeabilizándola y generando liberación rápida de los componentes citosólicos solubles (Ramsby & Makowski, 2011). La concentración de digitonina utilizada en este ensayo para permeabilizar la membrana de los epimastigotes fue previamente determinada en nuestro laboratorio (Bouvier *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2009).

El patrón de extracción de la enzima glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺, que se localiza en el citoplasma del parásito, se usó como marcador de la estabilidad de la membrana (Barderi *et al.*, 1998). Mediante un análisis por *Western blot* no se observó presencia de glutamato deshidrogenasa en sobrenadantes de epimastigotes tratados con concentraciones de hasta 100 μM de la droga por 30 minutos (valores cercanos a las IC₅₀ obtenidas para el transporte de putrescina y de aminoácidos) (Figura 36 A). Estos resultados sugieren que la estructura de la membrana plasmática permanece inalterada en las concentraciones usadas de isotretinoína. En cambio, en los ensayos del control positivo usando 0,3 mg/ml de digitonina el marcador citosólico fue totalmente extraído, observándose en el sobrenadante (Figura 36 B).

Estos resultados indican que la isotretinoína no afecta la estructura de la membrana plasmática del parásito y junto con los resultados de los ensayos de transporte validan a la droga como un inhibidor específico de los transportadores de poliaminas y aminoácidos de la familia TcAAAP.

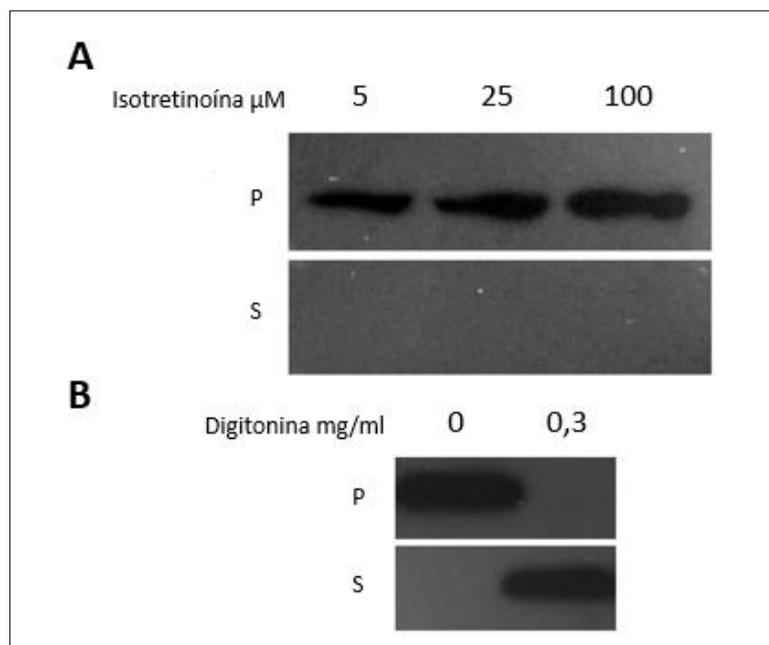


Figura 36. Efecto de la isotretinoína sobre la membrana plasmática de *T. cruzi*. Western blot usando anticuerpos anti-glutamato deshidrogenasa de *T. cruzi* en **A)** epimastigotes tratados con 5, 25 y 100 μM de isotretinoína por 30 minutos o **B)** tratados con el detergente digitonina (0 y 0,3 mg/ml) como control de extracción. Las líneas superiores e inferiores de cada figura corresponden a *pellets* (P) y sobrenadantes (S) luego de las extracciones, respectivamente. La proteína glutamato deshidrogenasa se localiza en el citoplasma de los parásitos.

2.2.5 Evaluación de la actividad tripanocida de la isotretinoína

Con el objetivo de analizar si la inhibición del transporte de putrescina podría afectar la viabilidad de los parásitos, se evaluó la toxicidad de la isotretinoína sobre el epimastigote y los estadios intracelulares de la cepa Y de *T. cruzi*.

Los epimastigotes fueron tratados con diferentes concentraciones del retinoide, en un rango de 0 a 300 μM , durante 72 horas. La droga fue efectiva como inhibidor del crecimiento de epimastigotes, con una IC_{50} de 30,6 ($\pm 1,33$) μM (Figura 37 A). Al observarse actividad tripanocida en el estadio del insecto vector se procedió a medir el efecto de la droga sobre la liberación de tripomastigotes, usando un modelo de infección *in vitro* en células CHO-K1. Las células luego de ser infectadas con *T. cruzi* durante 4 horas y lavadas, fueron expuestas a la isotretinoína por 24 horas en un rango de concentraciones de 0 a 30 μM . La droga inhibió a concentraciones muy bajas la liberación de tripomastigotes después de seis días de infección, con una IC_{50} calculada de 130 (± 10) nM (Figura 37

B). Este valor de IC_{50} es significativamente menor que los obtenidos para los medicamentos actualmente utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (IC_{50} para nifurtimox $0,9 \mu\text{M}$; y para benznidazol $3,8 \mu\text{M}$, calculados en el punto 2.1.1 de este capítulo).

Los ensayos hechos sobre células infectadas con el parásito fueron realizados en colaboración con la Dr. Carla C. Avila de la Universidad de San Pablo, Brasil.

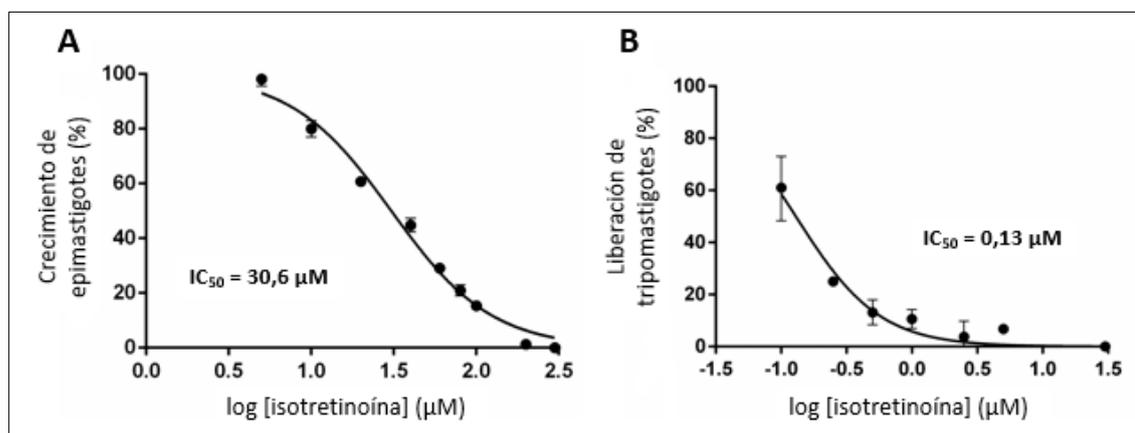


Figura 37. Actividad tripanocida de la isotretinoína en *T. cruzi*. **A)** Cultivos de epimastigotes (1×10^7) fueron tratados con diferentes concentraciones de isotretinoína entre 0 y $300 \mu\text{M}$ por 72 horas. La densidad celular está expresada como el porcentaje respecto de los parásitos no tratados ($6,6 \times 10^7$ células/ml). **B)** Células CHO-K1 fueron infectadas con tripomastigotes (en una proporción de 1:50) durante 4 horas. Luego, las células infectadas se trataron con isotretinoína (0- $30 \mu\text{M}$) por 24 horas. Después del tratamiento, se tomaron tripomastigotes del medio extracelular en el sexto día post-infección. La densidad de los mismos está expresada como el porcentaje respecto del control sin tratamiento ($1,23 \times 10^6$ células/ml). En ambos casos el valor de IC_{50} se calculó mediante regresión no lineal usando el software GraphPad Prism v.6.

A fin de evaluar la selectividad de la isotretinoína hacia los parásitos, se determinó la toxicidad de la misma sobre dos modelos de células de mamíferos, macrófagos derivados de monocitos procedentes de sangre periférica humana (células no transformadas) y la línea celular transformada CHO-K1, utilizada en este trabajo. Los macrófagos se expusieron a la droga durante 24 horas en un rango de concentraciones de 0 a $400 \mu\text{M}$ y se obtuvo una IC_{50} de $119,6 (\pm 7,3) \mu\text{M}$. Luego, se determinó el índice de selectividad ($IS = IC_{50}$ para isotretinoína contra los macrófagos / IC_{50} para la droga contra los parásitos), con un valor de aproximadamente 920. Resultados similares se obtuvieron utilizando las células CHO-K1.

También se midió el efecto de la droga sobre la replicación de los amastigotes mediante el cálculo del índice de infección (% de células infectadas x número promedio de amastigotes por célula infectada) (Silva *et al.*, 2007) de las células infectadas tratadas con isotretinoína comparadas con el control. Para las células control fue de $6,44 (\pm 1,55)$, y para las células tratadas con 65, 130 y 260 nM del retinoide fueron de $6,49 (\pm 1,98)$, $4,13 (\pm 1,16)$ y $3,61 (\pm 0,94)$, respectivamente. Cuando las células

infectadas con *T. cruzi* se trataron con 130 y 260 nM del medicamento, hubo aproximadamente un 40 % de reducción en el índice de infección respecto a las células no tratadas (Figura 38).

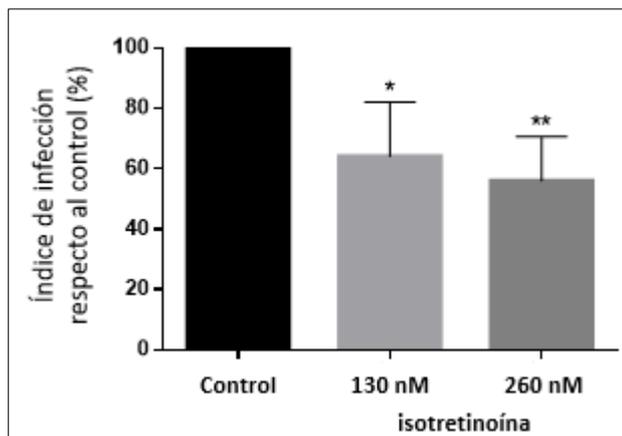


Figura 38. Efecto citotóxico de la isotretinoína en la replicación de amastigotes de *T. cruzi*. Cálculo del índice de infección (% de células infectadas x número promedio de amastigotes por célula infectada) de las células (CHO-K1) infectadas tratadas con isotretinoína 0 (control), 130 y 260 nM por 24 horas. El gráfico representa los % de los valores del índice de infección en comparación con el control. *, $p = 0,0281$; **, $p = 0,0081$, comparados con el grupo control sin droga, calculados usando el test-T con el programa GraphPad Prism v.6.

En síntesis, la isotretinoína afectó los estadios del hospedador mamífero de *T. cruzi*, en concentraciones nanomolares, con un índice de selectividad muy alto.

En la Tabla 9 se resumen los resultados obtenidos.

	Isotretinoína
Inhibición del transporte de poliaminas y aminoácidos, IC₅₀ (μM ± ES)	
Putrescina	4,6 ± 0,28
Prolina	10,3 ± 2,01
Lisina	5,1 ± 0,68
Mezcla de aminoácidos	5,8 ± 1,04
Actividad tripanocida, IC₅₀ (μM ± ES)	
Epimastigotes	30,6 ± 1,33
Liberación de tripomastigotes (células CHO-K1 infectadas)	0,13 ± 0,01
IS	
Macrófagos humanos/ <i>T. cruzi</i>	920

Tabla 9. Efecto de la isotretinoína en el transporte de poliaminas y aminoácidos y en la viabilidad de *T. cruzi*. IC₅₀ de la isotretinoína para la inhibición de transportadores de poliaminas y aminoácidos de la familia TcAAAP en epimastigotes, y para la actividad tripanocida en epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*. IS, índice de selectividad (IC₅₀ de la isotretinoína contra macrófagos humanos/ IC₅₀ de la droga contra tripomastigotes). Los valores de IC₅₀ están expresados en μM ± ES (error estándar). Mezcla de aminoácidos: Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr y Val.

A continuación se evaluó un posible mecanismo de muerte celular que pueda ser inducido por la isotretinoína.

2.2.6 Determinación del mecanismo tripanocida de la isotretinoína

Con el objetivo de determinar si un posible mecanismo de muerte de los parásitos frente a la isotretinoína es mediante la muerte celular programada se evaluaron diferentes parámetros en epimastigotes: i) exposición de residuos de fosfatidilserina en la cara extracelular de la membrana citoplasmática y permeabilización de la membrana plasmática; ii) fragmentación de ADN generada por la acción de endonucleasas y; iii) presencia de cuerpos apoptóticos.

En primera instancia se probaron concentraciones cercanas a la IC₅₀. Los parásitos tratados con 30, 60 y 120 μM de isotretinoína durante 72 horas fueron incubados con anexina-V FITC (AV) para medir la exposición externa de fosfatidilserina y con yoduro de propidio (IP) para evaluar la permeabilización de la membrana plasmática. Luego, fueron analizados por citometría de flujo. Las células AV-/IP- se consideran intactas, células AV+/IP- es representativo de la apoptosis temprana, células AV+/IP+ es característico de apoptosis tardía o necrosis y las células AP-/IP+ se consideran

necróticas con un daño significativo de la membrana (dos Anjos *et al.*, 2016). En las células analizadas no se detectaron signos de muerte celular (Figura 39).

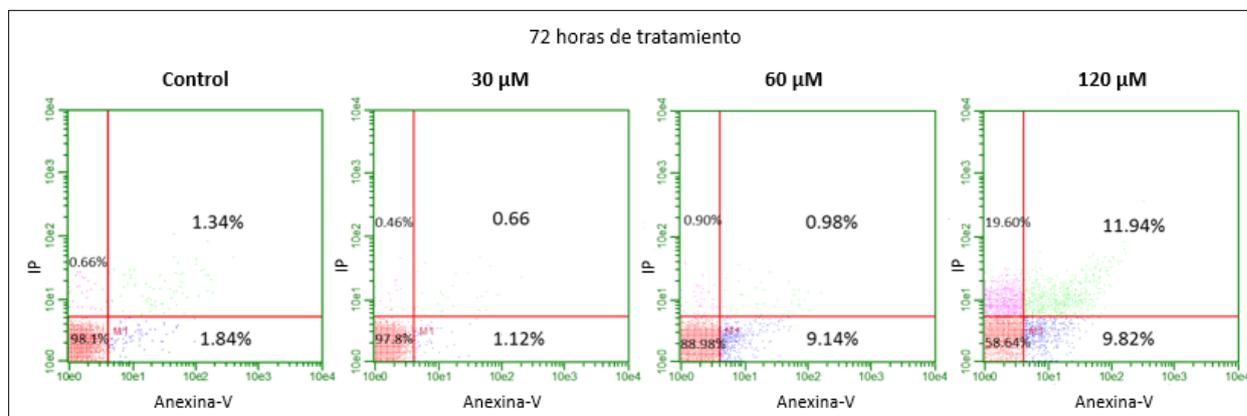


Figura 39. Análisis de apoptosis en epimastigotes de *T. cruzi* tratados con isotretinoína. Se estudió mediante citometría de flujo la exposición de fosfatidilserina (anexina-V, eje x) en la membrana plasmática y exclusión de yoduro de propidio (IP, eje y) en epimastigotes tratados con isotretinoína (30, 60 y 120 µM) y no tratados (control) durante 72 horas. En ninguna de las concentraciones probadas se observó apoptosis.

Para evaluar otro de los fenotipos de muerte celular programada que pueda ser inducido por la droga, se realizó el ensayo de TUNEL con el objetivo de detectar fragmentación de ADN. Los fragmentos de ADN se detectan marcándolos con fluorescencia mediante un proceso enzimático. Como se muestra en la Figura 40, epimastigotes tratados con la concentración de isotretinoína correspondiente a la IC₅₀, 30 µM durante 72 horas, presentaron una tinción negativa con dicha técnica. Parásitos sin tratar o tratados con ADNasa I se utilizaron como controles negativo y positivo, respectivamente.

Dado los resultados negativos se probaron otras condiciones de ensayo con el fin de detectar apoptosis o necrosis que pueda ser desencadenada por la isotretinoína. Para ello, se calculó un nuevo valor de IC₅₀ en parásitos tratados con la droga (0-400 µM) durante un tiempo de exposición menor (6 horas), con un valor de 214 µM. En este caso, los epimastigotes tratados por 6 horas con la concentración del retinoide correspondiente a la IC₅₀ presentaron TUNEL positivo en un 64,9% (± 0,03) con cambios en su morfología, células redondeadas. En estas condiciones, el ADN genómico y el ADN del kinetoplasto se marcaron, mientras que los parásitos no tratados permanecieron sin marca, indicando que la isotretinoína produce fragmentación del ADN (Figura 40).

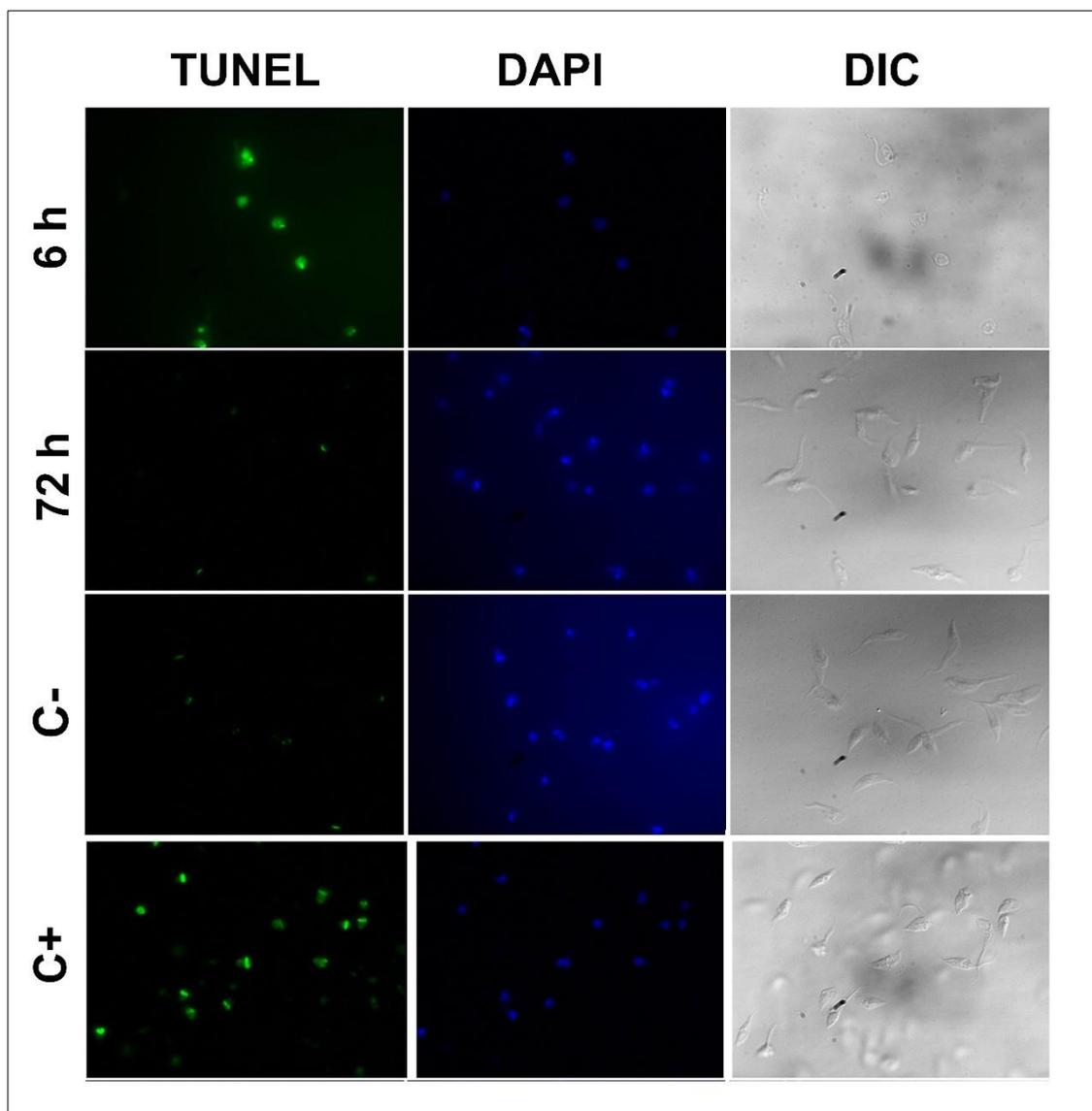


Figura 40. Imágenes de fluorescencia representativas de ensayos de TUNEL en epimastigotes de *T. cruzi*. Parásitos control tratados con ADNasa I (control de la técnica, C+), parásitos control sin tratar (apoptosis negativa, C-) o tratados con 200 o 30 μM de isotretinoína por 6 o 72 horas, respectivamente. Los epimastigotes se fijaron y permeabilizaron después de la reacción de TUNEL (verde) y se tiñeron con DAPI (azul). Las imágenes adquiridas por microscopía de fluorescencia bajo el objetivo 100x mostraron TUNEL positivo en el control de ADNasa I y en células tratadas con 200 μM de droga durante 6 horas. Las imágenes de contraste diferencial de interferencia (DIC) mostraron las diferencias en la morfología celular después de 6 horas de exposición con la isotretinoína.

Bajo estas condiciones también se evaluó la exposición de fosfatidilserina y la exclusión de yoduro de propidio. El análisis por citometría de flujo mostró que el 21,3% de los parásitos tratados expusieron fosfatidilserina en la membrana plasmática y toda la población celular dio negativa para yoduro de propidio, mientras que en el control ambos marcadores dieron negativos (Figura 41). Estos resultados sugieren que los parásitos tratados con 200 μM de la droga entraron en apoptosis y que la necrosis no estaría involucrada como un mecanismo de muerte celular.

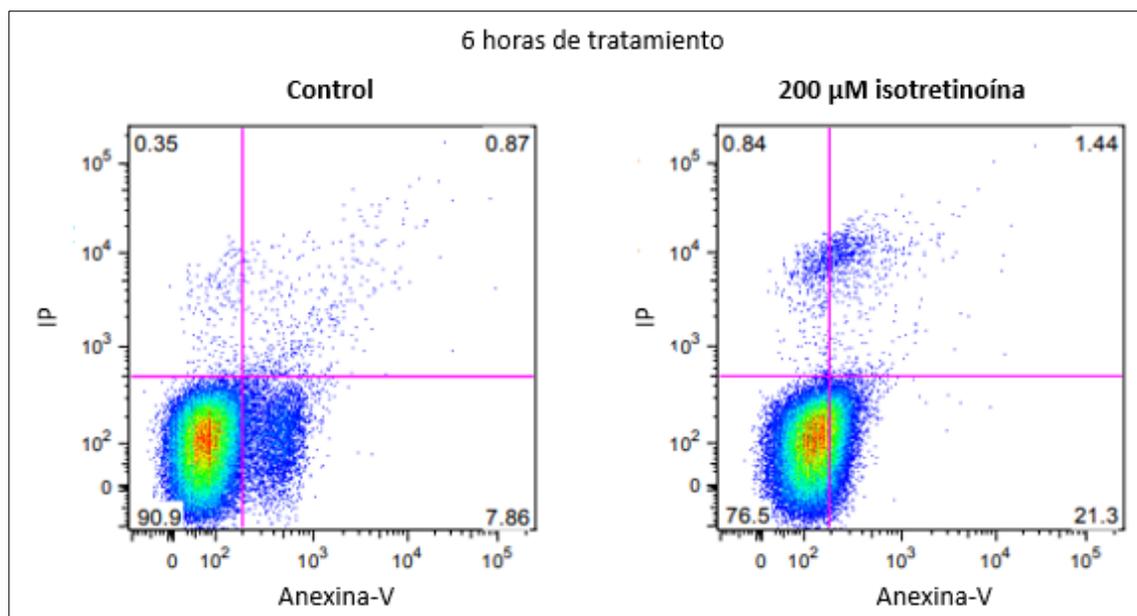


Figura 41. Análisis de apoptosis en parásitos de *T. cruzi* tratados con isotretinoína. Se evaluó mediante citometría de flujo la exposición de fosfatidilserina (anexina-V, eje x) en el lado externo de la membrana plasmática y la exclusión de yoduro de propidio (IP, eje y) en epimastigotes tratados con 200 μ M de isotretinoína y no tratados (control) durante 6 horas. Los parásitos expuestos a la droga dieron positivos para anexina-V.

También se usó la doble tinción fluorescente con naranja de acridina y bromuro de etidio para detectar cambios en la membrana celular durante el proceso de apoptosis en parásitos tratados con la droga. Trabajos previos (Kuan *et al.*, 2015) indican que el naranja de acridina penetra las células normales y las células en apoptosis temprana con las membranas plasmáticas intactas, emitiendo fluorescencia verde cuando se une al ADN. En cambio, el bromuro de etidio sólo ingresa en células con membranas dañadas, como en células apoptóticas tardías y muertas, que emiten fluorescencia naranja-roja cuando se unen a fragmentos concentrados de ADN o cuerpos apoptóticos. Cuando los epimastigotes tratados con 200 μ M de isotretinoína fueron teñidos con los marcadores de ADN se detectaron cuerpos apoptóticos de color naranja, mientras que en el control no se detectó apoptosis (Figura 42), indicando que el retinoide induce este mecanismo de muerte celular programada en los parásitos.

La autofagia es un proceso catabólico por el cual las células bajo condiciones de estrés nutricional degradan sus propios componentes proteicos para proporcionar aminoácidos que puedan funcionar como fuente de energía (Jimenez *et al.*, 2008). Durante este proceso, porciones del citoplasma son ingeridos por vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, que posteriormente se fusionan con los lisosomas, donde los materiales son degradados por hidrolasas ácidas (Schoijet *et al.*, 2017). Este mecanismo ha sido asociado a procesos tan importantes como la diferenciación entre estadios de desarrollo, la patogenicidad y la supervivencia de los tripanosomátidos (Brennand *et al.*,

2012). Considerando que la isotretinoína inhibió el transporte de poliaminas y aminoácidos, la consecuente falta de nutrientes podría iniciar un proceso autofágico en el parásito. Para corroborar esta hipótesis, los parásitos fueron evaluados usando un marcador fluorescente que se acumula en vacuolas autofágicas denominado monodansilcadaverina (MDC) (Biederbick *et al.*, 1995). Los epimastigotes tratados con 200 μ M de isotretinoína por 6 horas presentaron estructuras redondeadas teñidas por dicho marcador (Figura 42). Finalmente, para validar la formación de estas estructuras autofágicas se evaluó por el método de inmunofluorescencia indirecta la localización subcelular de la proteína TcAtg8.1, un marcador de membrana autofagosomal (Alvarez *et al.*, 2008). Mediante el uso de este marcador se detectaron autofagosomas también en parásitos tratados por 6 horas con 200 μ M de la droga (Figura 43), sugiriendo que este mecanismo de autofagia puede ser provocado por la isotretinoína.

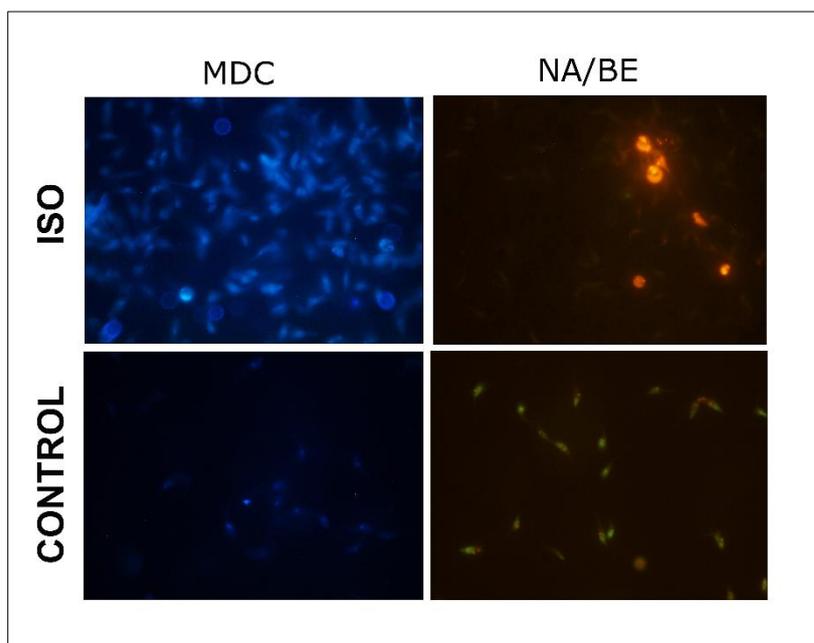


Figura 42. Imágenes de microscopía de fluorescencia de cuerpos apoptóticos y vacuolas autofágicas en epimastigotes de *T. cruzi* tratados con isotretinoína. Los parásitos fueron incubados con 200 μ M de isotretinoína por 6 horas (iso) y sin la droga (control). Luego, los mismos fueron evaluados con monodansilcadaverina (MDC) para detectar autofagosomas (azul). Para identificar apoptosis fueron teñidos con naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BE). Los cuerpos apoptóticos se observan en naranja.

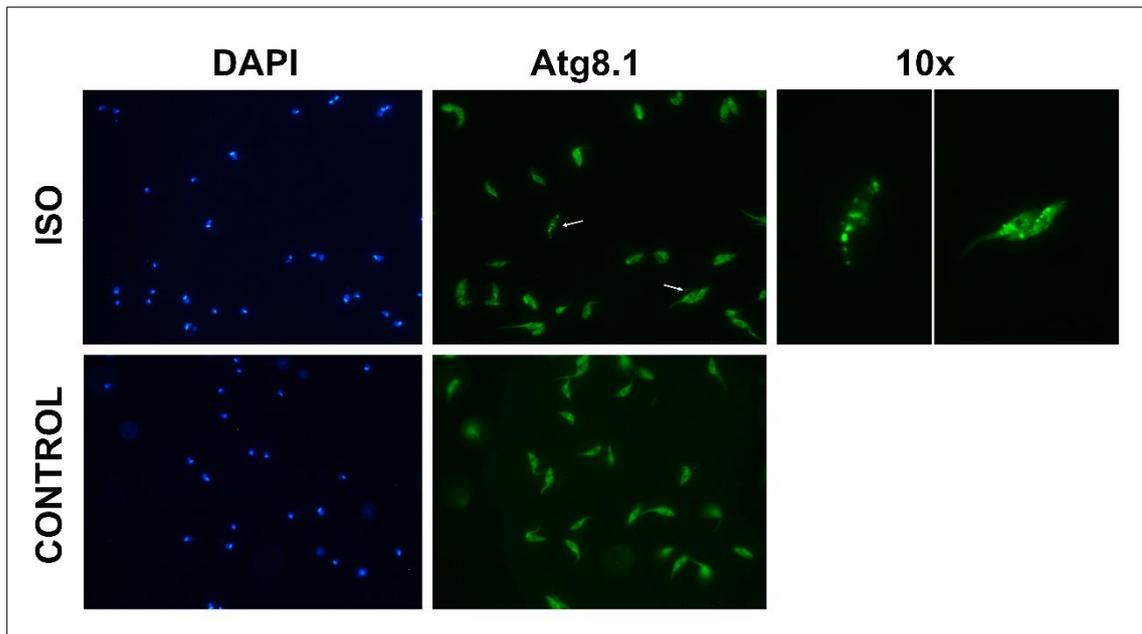


Figura 43. Análisis de estructuras autofágicas en epimastigotes de *T. cruzi* expuestos a la isotretinoína. Microscopía de inmunofluorescencia indirecta sobre epimastigotes tratados con 200 μ M de isotretinoína por 6 horas y no tratados (control), usando anticuerpos anti-Atg8.1. La proteína Atg8.1 es un marcador de membrana autofagosomal (verde). Las flechas indican los parásitos que fueron ampliados 10x en las imágenes de la derecha. El ADN fue marcado con DAPI (azul).

En la Figura 44 se esquematiza el posible mecanismo tripanocida de la isotretinoína.

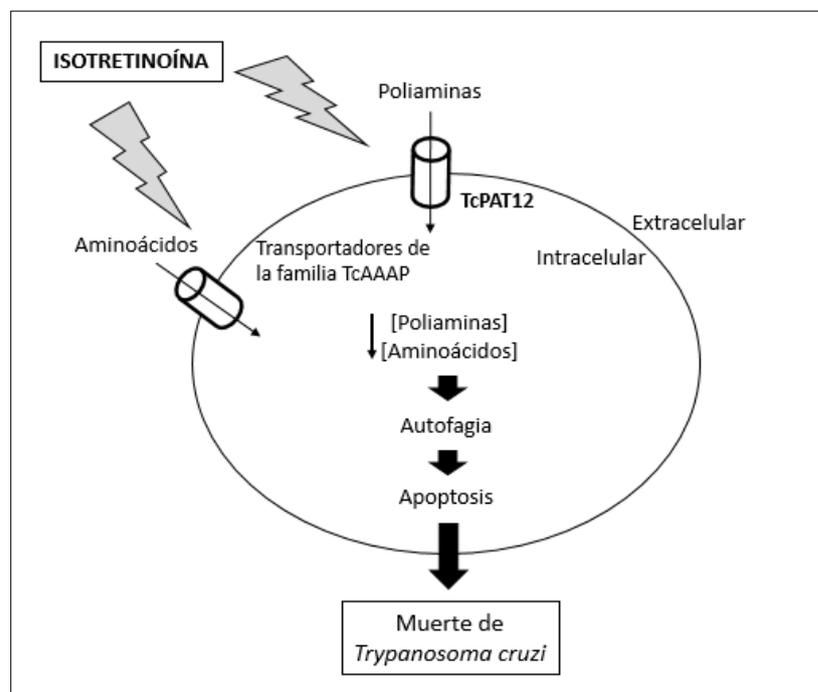


Figura 44. Esquema del posible mecanismo tripanocida inducido por la isotretinoína. La falta de nutrientes en el parásito dada por el efecto inhibitorio de la isotretinoína sobre los transportadores de poliaminas y aminoácidos de la familia TcAAAP, podría iniciar un proceso autofágico del que no se recuperarían las células, terminando en la muerte de *T. cruzi* por apoptosis.

2.3 Prueba de análogos sintéticos de poliaminas

Con el objetivo de encontrar nuevos candidatos a drogas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, a continuación se evaluó la actividad de diferentes análogos sintéticos de poliaminas sobre el transporte de estas moléculas en *T. cruzi* y se estudiaron los efectos sobre la viabilidad del parásito.

2.3.1 Estructuras de los análogos de poliaminas

Los análogos de poliaminas estudiados en este capítulo fueron diseñados y sintetizados por investigadores de la Universidad de Florida Central (USA) para el tratamiento contra el cáncer. Los nombres de los compuestos son los siguientes: Trimer44, Trimer44NMe, Triamide44, Triamide444, Triamide343, Ant4, Ant44 y AMXT 1501 (sección de materiales y métodos).

Se ha demostrado que las líneas celulares de cáncer contienen niveles elevados de poliaminas y tienen sistemas de transporte activos para importarlas desde el medio extracelular, facilitando la incorporación de conjugados de poliamina-droga a estas células (Muth *et al.*, 2014). Por ejemplo, Ant4, un conjugado de putrescina-antraceno (un agente intercalante del ADN), no sólo resultó ser citotóxico sino también redujo significativamente el transporte de putrescina, sugiriendo que además de usar el sistema de transporte de poliaminas también podría inhibir su ingreso a la célula (Palmer *et al.*, 2009). A su vez, debido a que las células de cáncer tienen altos requerimiento de poliaminas, la combinación de DFMO, un inhibidor de la enzima ODC que participa en la síntesis de poliaminas, con inhibidores del transporte de estos metabolitos resulta en una disminución de las poliaminas intracelulares y en la consecuente muerte de estas células (Seiler *et al.*, 1996). Por ejemplo, los conjugados de homoespermidina Trimer44 y Trimer44NMe bloquearon el transporte de espermidina en líneas celulares de cáncer tratadas con DFMO, reduciendo los niveles de poliaminas intracelulares y, por consiguiente, también el crecimiento celular (Muth *et al.*, 2014). Otro caso es el inhibidor del transporte de poliaminas denominado AMXT 1501, que junto con el DFMO bloquean el crecimiento de la mayoría de los cánceres de tumores sólidos (Hayes *et al.*, 2014). Actualmente la compañía Aminex Therapeutics está realizando estudios clínicos de fase I con AMXT 1501 en combinación con DFMO para evaluar su seguridad y determinar la dosis óptima de la terapia en pacientes con tumores sólidos avanzados (<http://aminextx.com/drug-candidate/clinical-trials/>). Por otro lado, Ant4 y Ant44 (un conjugado de antraceno-homoespermidina) inhibieron la incorporación de putrescina y espermidina en la forma trofozoíto de *P. falciparum* y además, presentaron un fuerte efecto contra

el parásito (Niemand *et al.*, 2013). El análogo de putrescina Triamide44 inhibió el transporte de putrescina en *Proteus mirabilis*, una bacteria que causa infecciones del tracto urinario en humanos, y en consecuencia disminuyó la aglutinación estimulada por la diamina y la invasión de células uroteliales (Kurihara *et al.*, 2013). Otros derivados de poliaminas fueron probados contra el hongo *Pneumocystis carinii* que causa neumonía en hospedadores inmunocomprometidos. Estos inhibidores del transporte de poliaminas redujeron la carga parasitaria, disminuyeron la inflamación pulmonar y prolongaron la supervivencia de la ratas con neumonía por *Pneumocystis*, sugiriendo que el transporte de poliaminas es un blanco prometedor para el tratamiento de esta enfermedad (Liao *et al.*, 2009).

Considerando que estos compuestos han sido probados con éxito como inhibidores del transporte de poliaminas en organismos protozoarios, líneas celulares de cáncer, bacterias y hongos, en este trabajo de tesis se los evaluó como posibles inhibidores del transporte de poliaminas y como drogas tripanocidas en los distintos estadios de *T. cruzi*.

Las estructuras de los análogos se encuentran esquematizadas en la Figura 45.

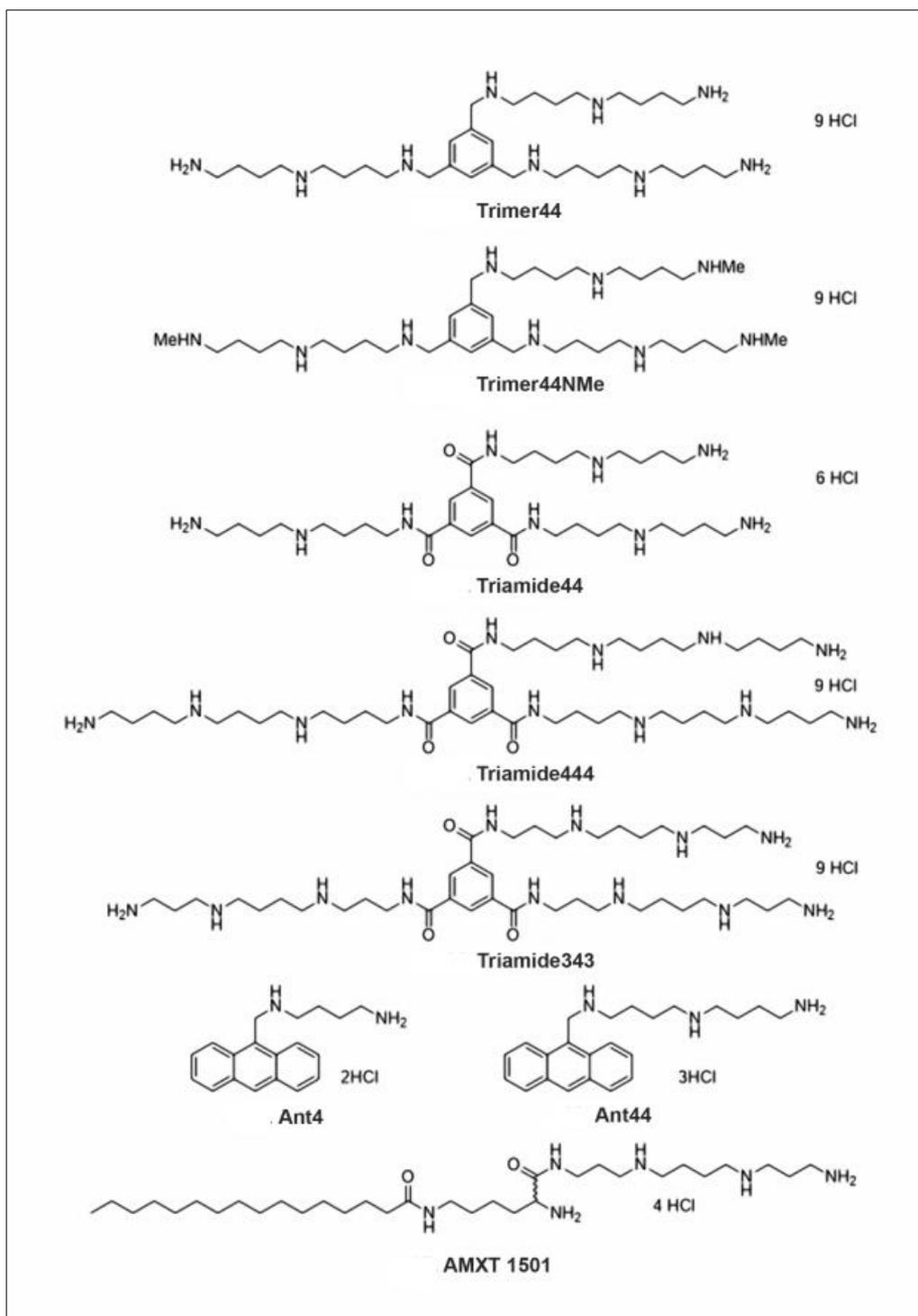


Figura 45. Estructuras químicas de los análogos sintéticos de poliaminas. Estructuras de los compuestos probados como inhibidores del transporte de poliaminas en *T. cruzi*.

2.3.2 Efecto sobre el transporte de poliaminas en epimastigotes de *T. cruzi*

Se probaron los ocho compuestos como posibles inhibidores del transporte de poliaminas en la cepa Y de *T. cruzi*. Para ello, se realizaron ensayos de transporte de putrescina y espermidina en

epimastigotes usando concentraciones similares a sus valores de K_m mencionados en el Capítulo 1 de este trabajo (5 y 15 μM , respectivamente), en presencia de los derivados de poliaminas en un amplio rango de concentraciones (0 - 30 μM). Aquellos compuestos que mostraron actividad inhibitoria en el transporte se volvieron a evaluar ajustando el intervalo de las concentraciones de acuerdo con los valores de inhibición obtenidos en el primer ensayo. Las concentraciones ensayadas no afectaron la viabilidad de los parásitos.

De los ocho compuestos, solamente los análogos Ant4, Ant44 y AMXT 1501 inhibieron significativamente el transporte de putrescina con valores de IC_{50} de 5,02 μM ($\pm 0,39$), 3,98 μM ($\pm 0,24$) y 2,43 μM ($\pm 0,15$), respectivamente (Figura 46).

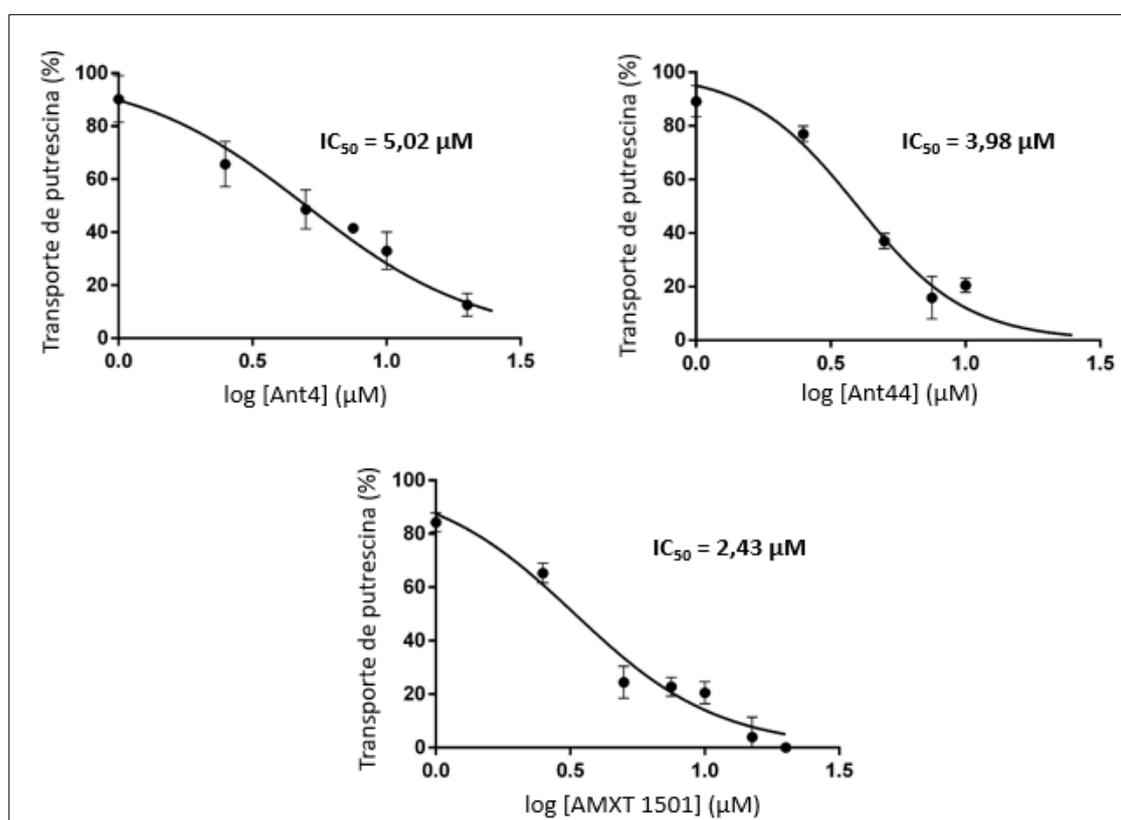


Figura 46. Efecto inhibitorio de los análogos de poliaminas sobre el transporte de putrescina en *T. cruzi*. El transporte de la poliamina se midió usando cultivos de epimastigotes (1×10^7) y 5 μM de [^3H]-putrescina, en presencia de los análogos (0-30 μM) por 10 minutos. Los valores de transporte se dan como el porcentaje de la tasa de transporte respecto de los parásitos no tratados (alrededor de 3 pmol/min). Los valores de IC_{50} se calcularon mediante regresión no lineal usando el software GraphPad Prism v.6.

Como se muestra en la Figura 47 Ant4 y Ant44 también inhibieron la incorporación de espermidina con valores de IC_{50} de 8,78 μM ($\pm 1,04$) y 13,34 μM ($\pm 0,94$), respectivamente.

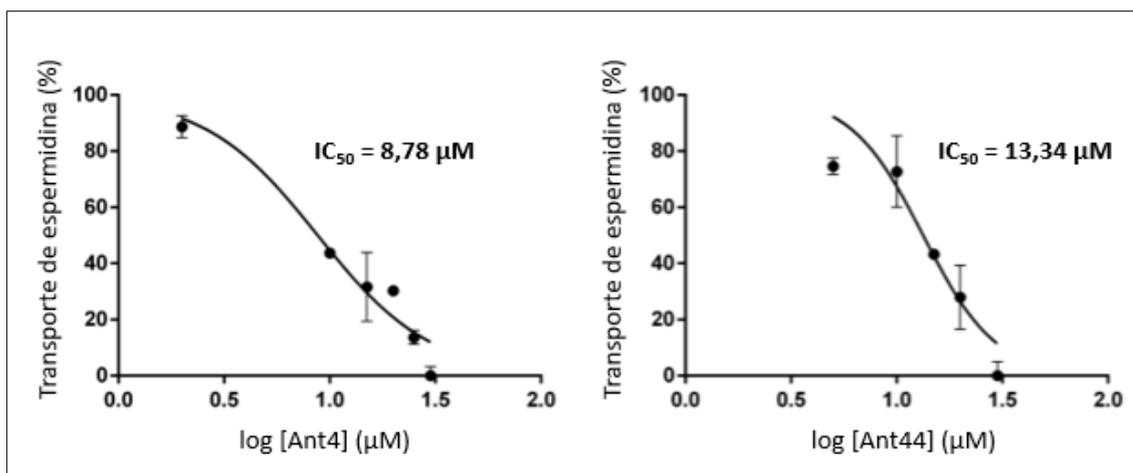


Figura 47. Efecto inhibitorio de los análogos de poliaminas sobre el transporte de espermidina en *T. cruzi*. El transporte de la poliamina se midió usando cultivos de epimastigotes (1×10^7) y $15 \mu\text{M}$ de $[^3\text{H}]$ -espermidina, en presencia de los análogos (0 - $30 \mu\text{M}$) por 10 minutos. Los valores de transporte se dan como el porcentaje de la tasa de transporte respecto de los parásitos no tratados (alrededor de $0,5 \text{ pmol/min}$). Los valores de IC_{50} se calcularon mediante regresión no lineal usando el software GraphPad Prism v.6.

2.3.3 Efecto tripanocida

Se probó la actividad tripanocida de los tres compuestos que mostraron una inhibición significativa sobre el transporte de poliaminas. Primero se evaluó el efecto de cada uno sobre el crecimiento del estadio epimastigote, en un rango de concentraciones de 0 a $100 \mu\text{M}$. Las IC_{50} fueron calculadas a las 48 horas post-tratamiento porque fue el menor tiempo donde se observó el mayor efecto. El análogo Ant4 fue el único compuesto que presentó actividad tripanocida con una IC_{50} calculada de $16,97 \mu\text{M}$ ($\pm 1,16$) (Figura 48). Luego, se evaluó el efecto del mismo sobre la viabilidad de tripomastigotes derivados de cultivo, en un rango de concentraciones de 0 a $2,5 \mu\text{M}$ durante 24 horas. El análogo de putrescina mostró un efecto potente sobre los parásitos con una IC_{50} de 460 nM ($\pm 25,2$), siendo 37 veces más sensible que el estadio epimastigote (Figura 49 A). Por último, se estudió el efecto del compuesto sobre un modelo de infección *in vitro* en células Vero. Las células infectadas con tripomastigotes fueron expuestas con el análogo durante 5 días con diferentes concentraciones entre 0 y $2,5 \mu\text{M}$. Luego de seis días de infección, Ant4 inhibió a concentraciones muy bajas la liberación de tripomastigotes con una IC_{50} similar a la obtenida para tripomastigotes aislados, de un valor de 520 nM (± 24) (Figura 49 B).

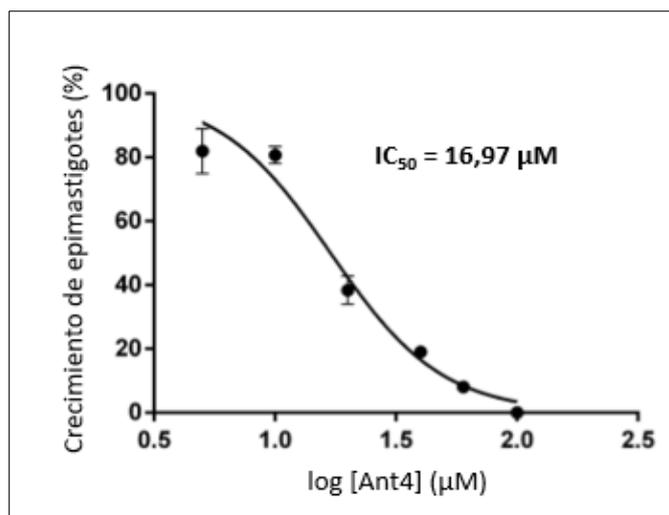


Figura 48. Efecto tripanocida de Ant4 sobre epimastigotes de *T. cruzi*. Curva de crecimiento de epimastigotes de la cepa Y tratados con Ant4 (0-100 μM) durante 48 horas. La densidad celular está expresada como el porcentaje respecto del control sin tratamiento ($2,4 \times 10^7$ células/ml). El valor de IC_{50} se calculó mediante regresión no lineal usando el software GraphPad Prism v.6.

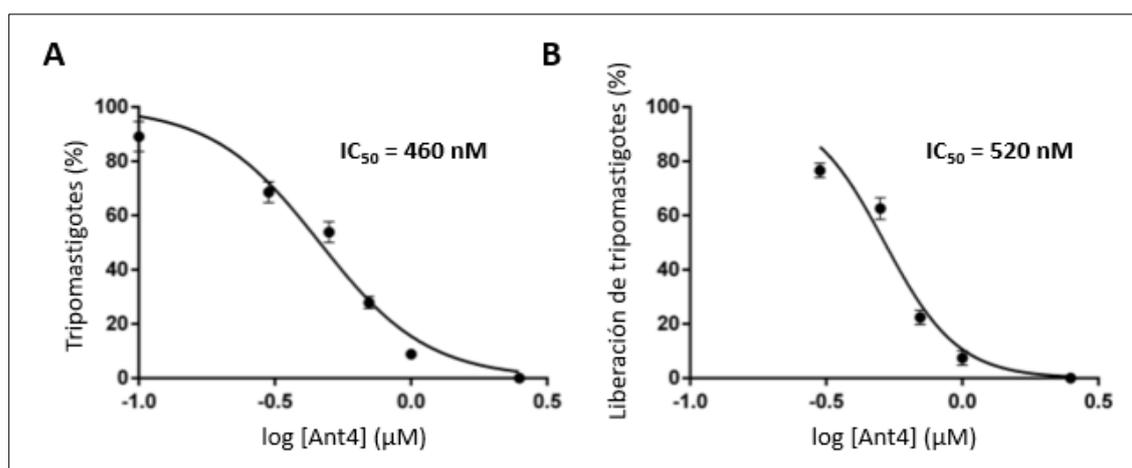


Figura 49. Efecto tripanocida de Ant4 sobre tripomastigotes y células infectadas de *T. cruzi*. **A)** Tripomastigotes aislados fueron expuestos por 24 horas con diferentes concentraciones de Ant4 entre 0 y 2,5 μM . La densidad celular está expresada como el porcentaje respecto de los parásitos no tratados ($1,3 \times 10^6$ células/ml). **B)** Células Vero infectadas con tripomastigotes se trataron con Ant4 (0-2,5 μM) durante 5 días. Luego, se tomaron tripomastigotes del medio extracelular en el sexto día post-infección. La densidad de los mismos está expresada como el porcentaje respecto del control sin tratamiento ($0,52 \times 10^6$ células/ml). En ambos casos el valor de IC_{50} se calculó de la misma forma que en la Figura 48.

A continuación se profundizó en la toxicidad de Ant4 en células de mamífero. Para ello, las células Vero fueron expuestas al derivado de putrescina por 24 horas en un rango de concentraciones de 0 a 50 μM y se obtuvo una IC_{50} de 5,86 ($\pm 0,26$) μM . Este valor coincide con otros previamente publicados para otras líneas celulares, como por ejemplo células CHO con una IC_{50} de 7,7 μM y células HL60 (*Human promyelocytic leukemia cells*) con una IC_{50} de 20 μM (Phanstiel IV *et al.*, 2007; Palmer *et al.*, 2009). Para evidenciar la citotoxicidad selectiva hacia *T. cruzi* se calculó el índice de selectividad

(IS) para Ant4, definido como el cociente entre sus valores de IC₅₀ para las células Vero y para tripomastigotes. Entre mayor sea esta relación, mayor será el valor de IS y por lo tanto la selectividad frente al parásito; en este caso se obtuvo un IS mayor a 10.

En la Tabla 10 se resumen los resultados obtenidos.

	Análogos de poliaminas		
	Ant4	Ant44	AMXT 1501
Inhibición del transporte de poliaminas, IC₅₀ (μM ± ES)			
Putrescina	5,02 ± 0,39	3,98 ± 0,24	2,43 ± 0,15
Espermidina	8,78 ± 1,04	13,34 ± 0,94	-
Actividad tripanocida, IC₅₀ (μM ± ES)			
Epimastigote	16,97 ± 1,16	-	-
Tripomastigote	0,46 ± 0,02	-	-
Liberación de tripomastigotes (células Vero infectadas)	0,52 ± 0,02	-	-
IS			
Vero/ tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	13	-	-

Tabla 10: Efecto de los conjugados de poliaminas en el transporte de poliaminas y en la viabilidad de *T. cruzi*. IC₅₀ de los compuestos Ant4, Ant44 y AMXT 1501 para la inhibición del transporte de poliaminas en epimastigotes, e IC₅₀ de Ant4 para la actividad tripanocida en epimastigotes, tripomastigotes y células infectadas con *T. cruzi*. IS, índice de selectividad (IC₅₀ de Ant4 contra células Vero/ IC₅₀ del compuesto contra tripomastigotes). Los valores de IC₅₀ están expresados en μM ± ES (error estándar).

2.3.4 Efecto del análogo Ant4 sobre el transporte de poliaminas en tripomastigotes de *T. cruzi*

Con el fin de estudiar si Ant4 inhibe la incorporación de poliaminas en tripomastigotes como se demostró en epimastigotes, se llevaron a cabo ensayos de transporte con las mismas concentraciones de poliaminas que fueron utilizadas con el estadio del insecto vector, 5 μM de putrescina y 15 μM de espermidina, en presencia del análogo en un rango de concentraciones de 0 a 25 μM. Estos valores del compuesto no afectaron la viabilidad de los parásitos. Al igual que en el estadio epimastigote, Ant4 inhibió en tripomastigotes el transporte de putrescina y espermidina con valores similares, obteniéndose IC₅₀ de 4,94 μM (±0,62) y 4,86 μM (±0,51), respectivamente.

Cabe destacar que la tasa de transporte de putrescina medida en este estadio (0,96 pmol/min x 10⁷ células) fue aproximadamente 3 veces menor que en epimastigotes, sugiriendo que al incorporar menos poliaminas tiene menor contenido intracelular de las mismas y por lo tanto menor tolerancia

a la inhibición de estos procesos de transporte. Estas observaciones se discuten en la siguiente sección.

Los resultados obtenidos indican que el conjugado de putrescina Ant4 actúa como un agente tripanocida en parte a través de la inhibición del transporte de poliaminas en epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*.

2.3.5 Influencia de Ant4 sobre el efecto del benznidazol

Una de las posibles estrategias terapéuticas contra las diferentes tripanosomiasis se basa en evaluar las drogas actualmente en uso en combinación con otros fármacos de manera de poder disminuir las dosis efectivas y los efectos adversos. Por esta razón se evaluó si el Ant4 potencia el efecto del benznidazol. Para ello, epimastigotes fueron expuestos durante 96 horas con 30 μM de benznidazol, 20 μM de Ant4 o la combinación de ambos compuestos. Las concentraciones ensayadas corresponden aproximadamente a los valores de IC_{50} obtenidos para la actividad tripanocida en epimastigotes (Luna *et al.*, 2009; este trabajo). El tratamiento conjunto produjo un aumento significativo sobre la inhibición del crecimiento de los parásitos comparado con los tratamientos individuales, indicando que la adición de 20 μM de Ant4 aumentó significativamente la potencia del benznidazol 11,2 veces luego de 96 horas de tratamiento (Figura 50).

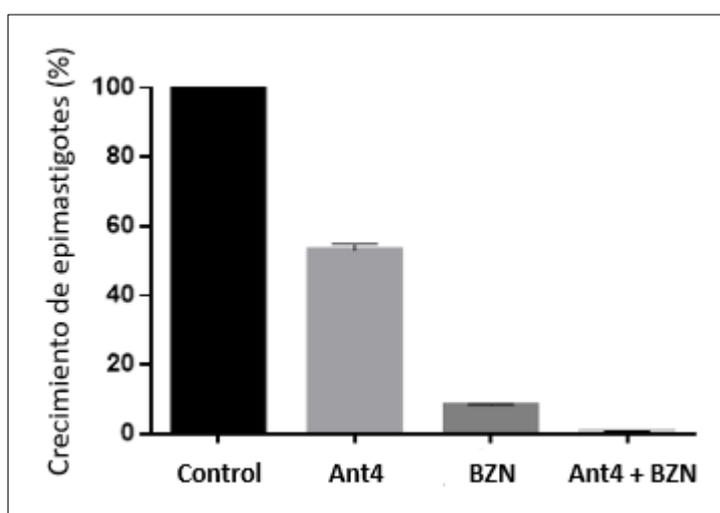


Figura 50. Influencia de Ant4 sobre el efecto de benznidazol en el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*. Los parásitos de la cepa Y fueron tratados con Ant4 (20 μM) o con benznidazol (BZN, 30 μM) o con la combinación de ambos compuestos durante 96 horas. El control corresponde a parásitos no tratados. **** $p < 0,0001$, calculado por ANOVA de un factor y prueba de Tukey para todas las comparaciones, con el programa GraphPad Prism v.6.

V-Discusión

A lo largo del ciclo de vida *T. cruzi* está expuesto a diferentes ambientes, en el tracto digestivo del insecto vector, en el torrente sanguíneo y también dentro de diferentes tipos celulares del hospedador mamífero (Barrett *et al.*, 2003). La disponibilidad de nutrientes en estos diferentes ambientes determina la necesidad de adaptaciones metabólicas complejas. En los tripanosomátidos, varios procesos de biosíntesis fueron parcial o totalmente reemplazados en la evolución por procesos de transporte, que son “económicos” energéticamente en comparación con las rutas biosintéticas. Los sistemas de transporte revisten particular importancia ya que en muchos casos son el primer paso de varias rutas metabólicas y de ellos depende la disponibilidad intracelular de sustratos (Pereira *et al.*, 2008). Por lo tanto, la obtención de ciertos metabolitos esenciales recae exclusivamente en la importación desde el medio extracelular. Además, se ha demostrado que los transportadores pueden facilitar la entrada a drogas tripanocidas o actuar como blancos de drogas (M. P. Hasne & Barrett, 2000; Meier *et al.*, 2018). El primer transportador de fármacos identificado en tripanosomátidos fue la permeasa de adenosina y adenina P2, que se relacionó originalmente con el transporte de melarsoprol y posteriormente al transporte de pentamidina, ambas drogas utilizadas en el tratamiento contra *T. brucei* y en el caso de la pentamidina también es utilizada contra la leishmaniasis (Carter & Fairlamb, 1993; de Koning & Jarvis, 1999). En *T. brucei* también se identificaron otros dos transportadores de pentamidina, denominados LAPT1 y HAPT1 (Munday *et al.*, 2015). Además, se demostró que la eflornitina, una droga utilizada para el tratamiento de la tripanosomiasis Africana, ingresa al medio intracelular a través de un transportador de aminoácidos neutros, TbAAT6. La pérdida de la permeasa TbAAT6 da como resultado parásitos resistentes a la eflornitina (Vincent *et al.*, 2010). En el caso de *L. major*, la acuaporina LmAQP1 media la captación de las drogas estibogluconato y antimonio de meglumina, que se utilizan para el tratamiento de la leishmaniasis. La sobre-expresión de dicha acuaporina produce un aumento de sensibilidad al tratamiento con compuestos antimoniales y arsenicales, y su delección induce la resistencia a estos tratamientos (Gourbal *et al.*, 2004). En *T. brucei* se encontró que el compuesto UK5099 (α -ciano- β -(1-fenilindol-3-il)acrilato) inhibe el transportador de alta afinidad para piruvato TbPT0, que resulta en la acumulación intracelular del metabolito causando acidificación, desestabilización osmótica y finalmente la muerte del parásito (Wiemer *et al.*, 1995; Sanchez, 2013). Considerando los antecedentes mencionados, el estudio de las proteínas implicadas en los procesos de transporte de metabolitos en *T. cruzi* resulta necesario para comprender mejor el metabolismo de estas moléculas y el posible rol de los transportadores para el desarrollo de nuevas drogas más específicas y eficientes que las disponibles en la actualidad. Un punto clave en el metabolismo de los tripanosomátidos está

asociado a las poliaminas. Estos policationes alifáticos, presentes en la mayoría de los organismos, participan en procesos celulares esenciales como en la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas, y en la proliferación y diferenciación celular (Pegg & Casero Jr., 2011). En estos parásitos además están involucradas en la síntesis de tripanotión, un conjugado de glutatión-espermidina fundamental para el equilibrio redox, exclusivo de estos organismos (Fairlamb *et al.*, 1985; Fairlamb & Cerami., 1992). Trabajos realizados en *T. brucei* y en distintas especies de *Leishmania* han demostrado que la biosíntesis de poliaminas ocurre mediante la acción inicial de la enzima ODC, y que el transporte de putrescina y espermidina desde el medio externo es relativamente reducido pero puede inducirse significativamente al disminuir los niveles endógenos de poliaminas (Phillips *et al.*, 1987; Sánchez *et al.*, 1989). De hecho, uno de los efectos de la droga eflornitina sobre *T. brucei* es la inhibición irreversible de la ODC y por lo tanto, la disminución de los niveles de poliaminas y del tripanotión (Vincent *et al.*, 2010). En contraste con otros parásitos protozoarios, *T. cruzi* es incapaz de sintetizar poliaminas *de novo* por carecer de los genes correspondientes a la ODC y la ADC, por lo tanto, la carencia de dichas actividades enzimáticas es reemplazada por un sistema de transporte de poliaminas desde el medio extracelular. Esto destaca la importancia de los sistemas de transporte para cubrir las necesidades metabólicas del parásito (Carrillo *et al.*, 2003). Interesantemente Hasne *et al.* (2016) demostraron que la interrupción génica de la permeasa de poliaminas TcPAT12 afecta la capacidad del parásito para mantener una infección en células de mamífero. Por estas razones, la identificación y caracterización funcional de los transportadores de poliaminas, especialmente en *T. cruzi*, son importantes en términos del diseño y la búsqueda de nuevas drogas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

El transportador de poliaminas TcPAT12

Hasta el momento un solo transportador de poliaminas fue caracterizado en *T. cruzi*, el TcPAT12. Primero, nuestro laboratorio lo caracterizó funcionalmente mediante su expresión en ovocitos de *X. laevis* y demostró ser un transportador de espermidina y putrescina, con características cinéticas similares a las medidas en epimastigotes de *T. cruzi* (Carrillo *et al.*, 2006). Posteriormente, se caracterizó la misma proteína en *T. cruzi*, denominada TcPOT1, como un transportador de alta afinidad para putrescina y cadaverina (Hasne *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se confirmó a través de la sobre-expresión del TcPAT12 en un modelo homólogo de *T. cruzi* que es un transportador de putrescina y espermidina. El mismo presentó una cinética saturable con ambos sustratos, con valores de la constante de afinidad aparente (K_m) en el

orden micromolar (TcPAT12, putrescina 18,3 μM y espermidina 30,3 μM ; control GFP, putrescina 10,8 μM y espermidina 14,9 μM). El aumento en los valores de K_m para las poliaminas, aproximadamente el doble, en los parásitos TcPAT12 respecto al control podría explicarse por pequeñas diferencias en el plegamiento y ensamblado de los transportadores en la membrana plasmática o a la titulación de otros componentes del sistema de transporte, debido a la sobre-expresión que podrían alterar la afinidad. El hecho de que los valores de K_m para putrescina y espermidina estén en el orden micromolar es fisiológicamente importante dado que el tracto digestivo del insecto vector donde se encuentra el epimastigote contiene cantidades micromolares de estas poliaminas (Hunter *et al.*, 1994). Además, estos valores de K_m resultaron ser de orden similar a los obtenidos en otros trabajos con tripanosomátidos. Por ejemplo, en epimastigotes *wild type* de *T. cruzi* y en un modelo de *X. laevis* que expresa niveles elevados del TcPAT12 o del transportador de poliaminas de *L. major* LmPOT1, las K_m aparentes por espermidina fueron de aproximadamente 14 μM (Carrillo *et al.*, 2006; Hasne & Ullman, 2005).

Los parásitos que sobre-expresan el transportador TcPAT12 presentaron no sólo mayores velocidades de incorporación de putrescina y espermidina sino también una mayor concentración intracelular de las mismas, aproximadamente 3 veces respecto al control. Por lo tanto, el aumento en la velocidad de transporte se refleja en una mayor acumulación de estos metabolitos dentro del parásito. La falta de mecanismos que regulen la concentración de poliaminas en estos rangos nos permite estudiar el efecto biológico de dicho incremento.

Estudiando el efecto de la sobre-expresión en el crecimiento de los parásitos se observó que epimastigotes transgénicos control (GFP) lograron sostener el crecimiento en un medio de cultivo con bajos niveles de poliaminas aportados por el suplemento del suero. En cambio, el crecimiento de epimastigotes que sobre-expresan el TcPAT12 en estas mismas condiciones fue significativamente menor. Por el contrario, considerando que las poliaminas son esenciales para la supervivencia y proliferación de *T. cruzi* se hubiera esperado que la tasa de crecimiento de estos parásitos fuese mayor que el control, ya que al tener mayores niveles intracelulares de estas moléculas podrían sustentar su crecimiento en dicho medio. Una hipótesis que podría explicar esta observación es que los parásitos TcPAT12 al estar sobre-expresando la permeasa transportan más poliaminas agotando la poca disponibilidad de estos metabolitos en el medio extracelular, y por lo tanto limitan su crecimiento. Por otro lado, ambos modelos de parásitos transgénicos presentaron un crecimiento similar en un medio rico en poliaminas, por consiguiente se puede descartar un efecto tóxico debido a un aumento en la concentración intracelular de las mismas y asociar el crecimiento limitado de los

parásitos TcPAT12 a otros factores como la disminución de las concentraciones de poliaminas extracelulares. Considerando que *T. cruzi* está expuesto a diferentes concentraciones de poliaminas durante su ciclo de vida, se necesita una regulación estricta para maximizar el uso de estos metabolitos extracelulares para la supervivencia del parásito. Cabe mencionar que Le Quesne *et al.* (1996) observaron que el transporte de putrescina en epimastigotes responde a la diamina exógena; el agregado de putrescina en el medio puede bloquear la inducción del transporte de la misma y demostraron que este bloqueo coincide con un aumento en la concentración total de poliaminas intracelulares. Sin embargo, pareciera ser que los parásitos TcPAT12 escapan a esta regulación debido a la sobre-expresión de la permeasa.

Poliaminas y resistencia a estrés

Durante su ciclo de vida *T. cruzi* está continuamente expuesto a diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) generadas por procesos endógenos y por la respuesta inmune del hospedador mamífero. Las ROS producen daño celular al reaccionar con diversas macromoléculas biológicas como proteínas, membranas lipídicas o ADN (Turrens, 2004). *T. cruzi* presenta grandes diferencias en sus mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo al compararlo con sus hospedadores mamíferos. Por ejemplo, no se ha detectado actividad catalasa en el parásito, y posee, al igual que *Leishmania* spp., *T. brucei* y *Plasmodium* spp., una isoforma de la superóxido dismutasa, normalmente presente sólo en bacterias (Wilkinson & Kelly, 2003; Turrens, 2004). En los tripanosomátidos las poliaminas son precursoras en la biosíntesis de tripanotión, un conjugado de glutatión-espermidina que mantiene el balance endógeno de óxido-reducción de los parásitos, y junto al ovotiol, son una de sus principales defensas contra superóxidos y radicales libres (Fairlamb & Cerami., 1992; Ariyanayagam & Fairlamb, 2001).

En este trabajo se demostró que un aumento en el transporte de poliaminas aumenta la resistencia de los parásitos TcPAT12 a diferentes condiciones de estrés generado mediante el tratamiento con peróxido de hidrógeno o las drogas tripanocidas nifurtimox y benznidazol. A su vez, los parásitos TcPAT12 presentaron una resistencia mayor a nifurtimox ($IC_{50,TcPAT12}/IC_{50,control} = 45,3$ y $2,6$ para nifurtimox y benznidazol, repectivamente). Esta diferencia podría deberse a que el nifurtimox genera radicales superóxido y aniones nitro, actuando a través de la inducción de estrés oxidativo en reacciones catalizadas por nitrorreductasas tipo I (Hall *et al.*, 2011). En cambio, el efecto tripanocida de benznidazol no sigue el mismo mecanismo. La generación de radicales del oxígeno a concentraciones que inhiben el crecimiento de *T. cruzi* no fue observada para esta droga. Parece

probable que los metabolitos reducidos de este fármaco, mediante unión covalente con diferentes moléculas, están involucrados en sus efectos tóxicos y tripanocidas. Estas moléculas incluyen tioles de bajo peso molecular y tioles proteicos. Además, el benznidazol produce una disminución de los tioles activos redox incluyendo al tripanotión (Trochine *et al.*, 2014). Con el objetivo de establecer una conexión entre el TcPAT12 y las resistencias observadas se evaluó uno de los mecanismos de resistencia a estrés en el que están involucradas las poliaminas. Como en *T. cruzi* estas moléculas son precursoras en la síntesis del tripanotión, podría ser que los niveles de este compuesto estuvieran más elevados en los parásitos transgénicos TcPAT12, presumiblemente por poseer más poliaminas intracelulares respecto del control. Sin embargo, no existieron diferencias significativas en el contenido de tioles totales de ambas líneas de parásitos. Aunque la técnica utilizada no es específica para tripanotión, los resultados indican que las resistencias observadas para las drogas y el peróxido de hidrógeno estarían mediadas por otros mecanismos que no actúan directamente sobre el compuesto tripanotión. Por ejemplo, se ha descrito que las poliaminas también pueden actuar directamente como antioxidantes o como *scavengers* de ROS, aunque el mecanismo no está totalmente dilucidado (Ha *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2015). Además, se ha sugerido que estas moléculas están involucradas en el mantenimiento de la estabilidad de la membrana en condiciones adversas, como la peroxidación de lípidos por ROS (Schuber, 1989). Las poliaminas también podrían participar en la regulación de los sistemas antioxidantes (Liu *et al.*, 2015; Stewart *et al.*, 2018). Por otro lado, la falta de un incremento en los niveles de tioles totales en los parásitos TcPAT12 podría explicar la mayor resistencia de los mismos a nifurtimox que a benznidazol, ya que esta última droga actuaría a través de la disminución de dichas moléculas incluyendo al tripanotión. Lo que es posible afirmar de acuerdo a los resultados presentados, es que la permeasa TcPAT12 está involucrada con las respuestas a estrés oxidativo y al generado con las drogas evaluadas. En conclusión, un incremento en la incorporación de poliaminas mediada por TcPAT12 le confiere al parásito una mayor protección contra diversas condiciones desfavorables. Asimismo, estos resultados permiten asociar al transportador con la resistencia a drogas tripanocidas. Es importante destacar esta observación ya que identificar nuevos procesos involucrados en el surgimiento de resistencias a drogas permitirá el desarrollo de nuevos fármacos tripanocidas más específicos y selectivos para el parásito.

Otros transportadores de poliaminas

El transportador TcPAT12 parece ser el único de alta afinidad para poliaminas del parásito, ya que Hasne *et al.* (2016) demostraron que un *knock-out* (inactivación génica) del TcPAT12 tuvo poco

impacto en la tasa de crecimiento de los epimastigotes, y que los mismos conservaron la capacidad de transportar estas moléculas a través de un mecanismo no saturable, de baja afinidad. Considerando la esencialidad del transporte de poliaminas para *T. cruzi* otras permeasas podrían funcionar como mecanismos secundarios de transporte de baja afinidad para las mismas. Estos datos son concordantes con observaciones previas de Le Quesne *et al.* (1996).

En el presente trabajo se identificaron cinco genes que codifican para posibles transportadores de poliaminas en el genoma de *T. cruzi* (TcPT-2/6), con cuatro ortólogos en *T. brucei* y dos en *L. major*. Sin embargo, la funcionalidad de estos genes todavía no se confirmó.

De los análisis bioinformáticos se pueden destacar varias características singulares. Tanto el TcPAT12 como las proteínas TcPT poseen estructuras similares, con 11 a 12 pasos transmembrana. Asimismo, los residuos identificados como relevantes para la interacción con los sustratos del TcPAT12 se encuentran conservados en las proteínas TcPT-2 y TcPT-3. Realizando un fenograma de las secuencias identificadas se puede observar que TcPAT12 forma parte de un *cluster* donde se ubican TcPT-2 y 3. El análisis de las secuencias sugiere que los TcPT, en especial TcPT-2 y 3, podrían ser transportadores de poliaminas. Sin embargo, estudios bioquímicos son necesarios para confirmar esta hipótesis.

Inhibidores del transporte de poliaminas

El reposicionamiento de drogas se refiere a encontrar nuevos usos terapéuticos para fármacos ya existentes, lo que posibilita introducir tratamientos innovadores en el mercado reduciendo considerablemente los tiempos y costos asociados al desarrollo de un medicamento novedoso (Bellera *et al.*, 2015). Las estrategias de reposicionamiento de fármacos ya han tenido cierto éxito en el campo de las enfermedades parasitarias. Por ejemplo, la eflornitina que originalmente se utilizó como medicamento contra el cáncer se introdujo con éxito para tratar la tripanosomiasis humana Africana. El nifurtimox es otro caso de reposicionamiento de drogas, esta vez a partir del tratamiento para la enfermedad de Chagas. El compuesto se aplica desde 2009 en combinación con eflornitina para acortar el tratamiento de la etapa avanzada de la enfermedad del sueño, provocada por *T. b. gambiense* (Ferreira & Andricopulo, 2016). El antifúngico amfotericina B y la miltefosina, originalmente desarrollado como un medicamento antineoplásico, se utilizan actualmente para tratar la leishmaniasis (Andrews *et al.*, 2014). Hasta la fecha, hay varios estudios de candidatos a medicamentos para ser reposicionados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas sin embargo, ninguno de estos han sido aprobados todavía (Ferreira *et al.*, 2016). Por ejemplo, el fexinidazol, un

fármaco que había estado en desarrollo preclínico en la década de 1970 como agente antimicrobiano que luego fue abandonado, actualmente está siendo evaluado por el proyecto Iniciativa de Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (en inglés *Drugs for Neglected Disease initiative*, DNDi) en ensayos clínicos como un tratamiento para la fase crónica de la enfermedad de Chagas y también para la tripanosomiasis Africana y la leishmaniasis visceral (Bahia *et al.*, 2014; Chappuis, 2018). La clomipramina es un antidepresivo tricíclico con actividad tripanocida que inhibe la enzima tripanotión reductasa. Interesantemente la droga reduce la fibrosis miocárdica en ratones infectados con *T. cruzi* (Fauro *et al.*, 2013). De hecho, la mayoría de los candidatos a medicamentos en fase clínica para estas enfermedades parasitarias son drogas reposicionadas.

Con el objetivo de descubrir nuevas drogas antichagásicas en el presente trabajo se identificaron dos inhibidores del transporte de poliaminas de *T. cruzi* con actividad tripanocida, que están aprobados para su uso en humanos: la isotretinoína y la pentamidina.

Pentamidina

La pentamidina es una diamidina aromática, clasificada como una droga antiparasitaria de amplio espectro que ha sido utilizada por décadas para el tratamiento contra *Leishmania* spp. y *T. b. gambiense* y algunos hongos como *P. jirovecii* (Wilkinson & Kelly, 2009). Muy poca evidencia existe sobre la actividad de la pentamidina contra *T. cruzi*. En el trabajo de Yorke (1940) se reportó que la droga es inactiva contra este parásito. Además, la evidencia disponible se basa únicamente en estudios de viabilidad del estadio epimastigote (Gonzalez *et al.*, 2007; Chan-Bacab *et al.*, 2009; Navarrete-Vazquez *et al.*, 2011), por lo que faltan estudios sobre el efecto de esta droga en los estadios del hospedador mamífero del parásito.

En colaboración con el Dr. López-Muñoz se demostró que la pentamidina es activa contra tripomastigotes de las cepas Y y Dm28c (UDTs TcII y TcI, respectivamente) de *T. cruzi*, con una potencia similar comparada con nifurtimox y benznidazol. Además, la droga no solo disminuyó la carga parasitaria en un modelo de infección *in vitro* sino también en corazones de ratones infectados con el parásito, que resultó en un aumento de la tasa de supervivencia.

El mecanismo de acción de la pentamidina todavía no está claro. Se postula que en *T. brucei* entra por al menos un transportador de nucleósidos y mata a los parásitos mediante su acumulación y unión al ADN mitocondrial. Sin embargo, la generación natural e inducida por drogas de parásitos viables que carecen de un kinetoplasto (ADNk) indica que la pérdida del ADNk no explica el mecanismo de muerte de la pentamidina (Schnauffer *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2013). Además, en

ensayos con varias diamidinas no encontraron una correlación entre la actividad tripanocida y la capacidad de unión al ADNk de estas drogas (Daliry *et al.*, 2011). Por lo tanto, otros mecanismos deben estar involucrados en la acción tripanocida de la pentamidina.

En tripanosomátidos la pentamidina está asociada a varias alteraciones en el transporte de poliaminas. Por ejemplo, se reportó que la droga bloquea el transportador de poliaminas LmPOT1 de *L. major*, que tiene aproximadamente 55% de similitud estructural con su ortólogo de *T. cruzi*, TcPAT12 (Hasne & Ullman, 2005; Carrillo *et al.*, 2006; Hasne *et al.*, 2010). También, varias diamidinas aromáticas han sido estudiadas en su capacidad para bloquear el transporte de poliaminas en *L. infantum*, de las cuales pentamidina fue la más activa (Balaña-Fouce *et al.*, 1989; Reguera *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos en el presente trabajo son coherentes con estos antecedentes y demuestran que la pentamidina inhibe el transporte de putrescina y espermidina en los estadios epimastigote y amastigote de *T. cruzi*.

Considerando que el parásito utiliza las poliaminas para sintetizar el tripanotión y la pentamidina inhibe el transporte de poliaminas, se hipotetizó que esta inhibición podría inducir la disminución intracelular del compuesto en *T. cruzi*. Sin embargo, la pentamidina no modificó el contenido intracelular del tripanotión. A pesar del fuerte efecto inhibitorio de la droga sobre el transporte, concentraciones tan altas como 50 μM no pudieron inhibir completamente la incorporación de putrescina, por lo que estos bajos niveles de transporte de la diamina podrían ser suficientes para mantener al tripanotión en niveles adecuados dentro del parásito. Además, teniendo en cuenta este resultado es posible que otros transportadores de poliaminas puedan existir en el parásito, como se plantea en este trabajo. Por otra parte, la droga tuvo el mismo efecto tripanocida y la misma actividad inhibitoria sobre el transporte de putrescina, independientemente de los niveles de expresión de la permeasa TcPAT12, indicando que a pesar de inhibir el transporte de poliaminas mediado por TcPAT12, el mismo no es el principal blanco de la pentamidina. Pese a la inhibición del transporte, la droga estaría ingresando al *T. cruzi* a través de otros transportadores incluyendo otras posibles permeasas de poliaminas. En conjunto, estos resultados sugieren que la pentamidina presenta más de un mecanismo de acción, inhibe el transporte de poliaminas y actuaría además sobre blancos intracelulares. De hecho esta droga es un inhibidor de la enzima AdoMetDC de *T. brucei*, implicada en la biosíntesis de poliaminas (Bitonti *et al.*, 1986). La misma tiene un 96% de identidad con la proteína de *T. cruzi*, por lo que es probable que la pentamidina también actúe sobre esta enzima y por ende tenga otros blancos moleculares.

La pentamidina está asociada a efectos adversos de diversa gravedad como por ejemplo dolor abdominal, náuseas, vómitos, leucopenia, anomalías renales y hepáticas. A pesar de estos efectos, su toxicidad es bien conocida debido al amplio uso de la droga desde la década de 1940, a diferencia de la síntesis de nuevas moléculas que requieren ensayos clínicos exhaustivos y caros antes de su uso en pacientes. Considerando sus efectos tripanocidas tanto *in vitro* como *in vivo*, sería interesante valorizar la posible utilización de la pentamidina contra la enfermedad de Chagas.

Isotretinoína

Dentro de las estrategias de reposicionamiento de fármacos asistido por computadora, la combinación de diferentes técnicas de rastreo o *screening* virtual aumenta la posibilidad de tener éxito en los posteriores estudios *in vitro* e *in vivo* (Ashburn & Thor, 2004). Cabe mencionar que Alberca *et al.* (2016) reportaron el primer estudio de reposicionamiento de drogas *in silico* para descubrir inhibidores del transporte de poliaminas en *T. cruzi*. Identificaron tres compuestos con actividad tripanocida, el triclabendazol, el sertaconazol y la paroxetina, que mostraron efectos inhibitorios sobre la proliferación de epimastigotes y sobre el transporte de putrescina. Posteriormente, identificaron mediante la misma técnica nuevos inhibidores del transporte de putrescina del parásito con actividad tripanocida, la cisaprida, un fármaco procinético (Dietrich *et al.*, 2018), la clofazimina, un agente antimicrobiano y la cinarizina, un medicamento utilizado para el mareo y trastornos del equilibrio (Alberca *et al.*, 2018).

Teniendo en cuenta el potencial del reposicionamiento de fármacos asistido por computadora, el mismo fue aplicado en esta tesis para identificar nuevos inhibidores del transporte de poliaminas de *T. cruzi* con potencial actividad tripanocida. Se comenzó con una búsqueda bibliográfica de compuestos que alteren el transporte o la concentración intracelular de estos metabolitos en tripanosomátidos. De dicha búsqueda se seleccionó el acetato de retinol como molécula de referencia para realizar un rastreo virtual basado en el ligando por similitud química a partir de una base de datos de drogas aprobadas por la FDA. De este rastreo se seleccionaron ocho retinoides con mayor puntaje de similitud estructural, que posteriormente fueron analizados mediante una segunda técnica *in silico* basada en el receptor conocida como *docking* molecular, usando como blanco un modelo por homología del TcPAT12. Esta técnica implica la simulación del reconocimiento molecular entre pequeñas moléculas (en este caso los ocho retinoides seleccionados) y un blanco macromolecular (el TcPAT12). Para describir las interacciones involucradas en el acoplamiento

ligando-TcPAT12 se obtuvo un *score* o puntuación asociado a la energía libre de interacción (ΔG). Según las predicciones, la isotretinoína fue el ligando que presentó el valor más bajo de energía de interacción, indicando que, entre todos los ligandos analizados, la isotretinoína formó el complejo más estable con el TcPAT12. El valor calculado de energía de unión de la droga al sitio de reconocimiento del sustrato de TcPAT12 fue de -10,78 kcal/mol. Este valor es similar al obtenido usando el AMXT 1501, un inhibidor del transporte de poliaminas de mamíferos (-14,01 kcal/mol) (Hayes *et al.*, 2014), y más bajo que aquellos de los sustratos naturales de TcPAT12, putrescina (-3,31 kcal/mol) y espermidina (-3,08 kcal/mol). Estos datos sugieren que la estabilidad del complejo isotretinoína-TcPAT12 es más alta que aquellos complejos formados con las poliaminas, debido probablemente a la mayor cantidad de átomos (23) capaces de participar en las interacciones moleculares.

Se seleccionó la isotretinoína para la evaluación *in vitro* debido a los resultados del *docking* y por ser un compuesto accesible y de bajo costo. Esta droga (ácido 13-cis-retinoico) es un derivado de la vitamina A usada principalmente en el tratamiento de acné severo, así como también para una serie de cánceres y algunas condiciones severas de la piel (Larsen & Jemec, 2003).

En el presente trabajo se demostró que la isotretinoína inhibió significativamente el transporte de putrescina en epimastigotes de *T. cruzi*. Además, otro de los retinoides obtenido de los ensayos de *docking*, la acitretina, también produjo una inhibición significativa sobre el transporte de la diamina, validando la estrategia de rastreo virtual utilizada.

Una vez validado el efecto de la isotretinoína sobre el transporte de poliaminas, se evaluó la inhibición de otros transportadores de aminoácidos de la misma familia TcAAAP. Interesantemente, inhibió otras permeasas de la familia sugiriendo que sus efectos no están limitados exclusivamente al TcPAT12. Teniendo en cuenta que los miembros de la familia de transportadores de aminoácidos y poliaminas TcAAAP presentan una elevada identidad de secuencia aminoacídica, con excepción del extremo N-terminal, la múltiple acción de la isotretinoína podría deberse a su interacción con las regiones más conservadas de estas permeasas. No se observó ningún efecto de la droga sobre proteínas estructuralmente no relacionadas, como los transportadores de nucleósidos y de hexosas, reforzando la hipótesis de que su acción estaría limitada a los miembros de la familia TcAAAP. El hecho de que la isotretinoína inhiba la actividad transportadora de diferentes proteínas (fármaco multidiana) resulta interesante desde el punto de vista de la baja posibilidad de la generación de resistencia.

La inhibición de la droga sobre el transporte de aminoácidos y putrescina se correlacionó con su actividad tripanocida en epimastigotes. La IC_{50} calculada para tripomastigotes fue en el orden nanomolar y aproximadamente 230 veces menor que la observada en epimastigotes, y además el efecto de la isotretinoína en tripomastigotes fue casi 3 órdenes de magnitud mayor que su efecto en macrófagos humanos. Estos resultados son importantes ya que sólo los estadios del parásito en mamíferos son relevantes desde una perspectiva terapéutica. Asimismo, la concentración a la que actúa la isotretinoína en este estadio de *T. cruzi* es un orden de magnitud menor que su concentración en plasma alcanzada durante el tratamiento del acné (promedio 1 μ M, después de la administración oral de 80 mg de la droga en pacientes con acné) (Orfanos & Zouboulis, 1998).

La autofagia es un mecanismo por el cual las células bajo estrés nutricional digieren sus propios componentes para proporcionar aminoácidos que pueden funcionar como una fuente de energía (Jimenez *et al.*, 2008), este proceso se reportó en tripanosomátidos hace más de 10 años (Brennan *et al.*, 2012). Estudiando un posible mecanismo de muerte de los parásitos inducido por la isotretinoína se detectaron autofagosomas y cuerpos apoptóticos, sugiriendo que la inhibición del transporte de poliaminas y aminoácidos por la droga y la consiguiente falta de dichos nutrientes en el parásito podría iniciar un proceso autofágico seguido por la muerte celular por apoptosis.

En resumen, la isotretinoína es una droga tripanocida prometedora por varios motivos: a) tiene actividad contra los estadios del hospedador mamífero en el orden nanomolar, b) actúa como un inhibidor de los transportadores de aminoácidos y poliaminas de la familia TcAAAP y, c) es una droga aprobada por la FDA y ampliamente utilizada en humanos, lo que reduce significativamente los requisitos para su aplicación en la terapia para la enfermedad de Chagas. Por estas razones se justifica realizar a futuro nuevos experimentos utilizando modelos murinos de infección aguda y crónica.

Los resultados obtenidos con la isotretinoína confirman la utilidad del desarrollo de modelos computacionales enfocados en el reposicionamiento de drogas capaces de reconocer inhibidores del transporte de poliaminas con actividad hacia *T. cruzi*.

Análogos de poliaminas

El uso de análogos de metabolitos ha sido ampliamente explorado, principalmente como inhibidores o bloqueadores de rutas metabólicas, como alternativa para la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos contra los tripanosomátidos. Por ejemplo, se comprobó que el compuesto T4C (L-triazolidina-4-ácido carboxílico), un análogo de prolina, disminuye la viabilidad del

T. cruzi sometido a condiciones de reducción de nutrientes y estrés oxidativo, sugiriendo que podría ser una droga terapéutica interesante si se combina con otras que producen, por ejemplo estrés oxidativo (Magdaleno *et al.*, 2009). También, nuestro grupo de trabajo demostró que otro análogo de prolina ITP-1G presentó actividad tripanocida a través de la inhibición de su transportador, siendo un interesante punto de partida para el diseño de nuevas drogas contra el parásito (Sayé *et al.*, 2017). Además, han sido evaluados diferentes derivados de poliaminas contra *T. cruzi* (Jagu *et al.*, 2017), como el compuesto SQ109, una diamina de etileno que se encuentra actualmente en ensayos clínicos avanzados para el tratamiento de la tuberculosis. Se encontró que el mismo es un potente inhibidor de los estadios tripomastigote y amastigote e interfiere con la biosíntesis de esteroides (Veiga-Santos *et al.*, 2015). Otro ejemplo es el derivado de poliaminas P3Py que presentó una mayor actividad tripanocida respecto al benznidazol y un índice de selectividad 50 veces mayor, y en ratones infectados disminuyó considerablemente el nivel de parasitemia (Olmo *et al.*, 2013). Como ya se mencionó en esta sección, Alberca *et al.* (2016) identificaron diferentes análogos de poliaminas, el triclabendazol, la peroxetina y el sertoconazol, por los cuales mostraron efectos inhibitorios sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* y sobre el transporte de putrescina. Además en *T. brucei* la eflornitina, un análogo de ornitina, se utiliza para tratar la tripanosomiasis Africana. Como se describió anteriormente, esta droga es un inhibidor irreversible de la ODC produciendo una fuerte disminución de la concentración intracelular de putrescina en los parásitos (Bacchi *et al.*, 1980; Fozard *et al.*, 1980). Esta disminución significativa de poliaminas también es letal para *T. cruzi*, pero la única forma de lograr este efecto es a través de la interrupción del transporte de las mismas desde el medio extracelular (Carrillo *et al.*, 1999, 2003).

Los análogos sintéticos de poliaminas que se estudiaron en este trabajo (Trimer44, Trimer44NMe, Triamide44, Triamide444, Triamide343, Ant4, Ant44 y AMXT 1501), diseñados y sintetizados por investigadores de la Universidad de Florida Central (USA) para el tratamiento contra el cáncer, fueron previamente probados con éxito como inhibidores del transporte de poliaminas en organismos protozoarios, líneas celulares de cáncer, bacterias y hongos (Seiler *et al.*, 1996; Liao *et al.*, 2009; Kurihara *et al.*, 2013; Niemand *et al.*, 2013; Hayes *et al.*, 2014; Muth *et al.*, 2014; Jagu *et al.*, 2017). En esta tesis se ensayó la capacidad de dichos compuestos de afectar el transporte de poliaminas de *T. cruzi* a fin de estudiar si el efecto tripanocida observado podría estar relacionado con el transporte de estos metabolitos.

Solamente los análogos Ant4, Ant44 y AMXT 1501 inhibieron el transporte de poliaminas en epimastigotes. Sin embargo, únicamente el compuesto Ant4 produjo un efecto tripanocida sobre

este estadio con un valor de IC_{50} cercano a $17 \mu M$, indicando que su capacidad de inhibir el transporte de poliaminas pareciera estar relacionada con su actividad contra el parásito. Además, este conjugado de putrescina presentó un fuerte efecto contra el estadio tripomastigote con una IC_{50} calculada de 460 nM . Dicho valor es prometedor desde que el benznidazol presenta IC_{50} de 10 a 100 veces más altas, dependiendo de la cepa del parásito (calculadas en este trabajo). Cuando se evaluó la toxicidad de Ant4 sobre células de mamíferos (Vero) se obtuvo una IC_{50} cercana a $6 \mu M$. Este valor coincide con otros previamente publicados para diferentes líneas celulares (HL-60, células de leucemia humana; L1210, células de leucemia murina; HepG2, células de hepatoma humano y; CHO, células derivadas de ovario de hámster chino) (Phanstiel *IV et al.*, 2007; Palmer *et al.*, 2009; Niemand *et al.*, 2013). A su vez, se obtuvo un índice de selectividad mayor a 10 confirmando que Ant4 tiene acción selectiva sobre *T. cruzi*.

El compuesto Ant4 no sólo inhibió el transporte de poliaminas en epimastigotes sino también en tripomastigotes con una IC_{50} similar, de aproximadamente $5 \mu M$, aunque en este estadio la tasa de transporte es aproximadamente 3 veces menor. Además, como se mencionó anteriormente, los tripomastigotes son mucho más sensibles al análogo que el estadio del insecto vector. La medición del transporte de poliaminas en los tripomastigotes, sin precedentes en la bibliografía, es de gran importancia dado que permiten asociar la tasa de transporte de diferentes estadios a los ambientes en los que se viven. El tripomastigote, presente en el hospedador mamífero, se encuentra en un ambiente muy estable en términos de condiciones extracelulares incluida la disponibilidad de poliaminas, mientras que el epimastigote está adaptado a un entorno muy fluctuante dentro del tracto digestivo del insecto vector. Estas diferencias podrían explicar que los tripomastigotes incorporen menos poliaminas que los epimastigotes; asimismo, permitirían explicar por qué los tripomastigotes son más sensibles al Ant4 ya que serían más vulnerables a la inhibición del transporte.

Como Ant4 tiene un grupo antraceno, un agente intercalante del ADN, es probable que otros blancos moleculares además del transporte de poliaminas sean críticos para determinar su actividad tripanocida. Una vez que el análogo se transporta dentro del parásito, podría interactuar a nivel del ADN e inducir daño en el mismo como ha sido reportado previamente para células humanas de cáncer (Palmer *et al.*, 2009). Además, se reportó que el antraceno también reacciona con otras moléculas como polinucleótidos, nucleótidos y nucleósidos, en particular con purinas (Dipple *et al.*, 1971). Por lo tanto, Ant4 actuaría a través de la inhibición de la incorporación de poliaminas y una

vez transportado dentro del parásito podría tener un modo adicional de toxicidad generado por el grupo antraceno.

Es interesante observar que de los análogos de poliaminas evaluados en la tesis, sólo los compuestos lipofílicos Ant4, Ant44 y AMXT 1501 inhibieron la incorporación de putrescina, y únicamente Ant4 y Ant44 inhibieron el transporte de espermidina en epimastigotes de *T. cruzi*. En cambio, los compuestos Trimer44, Trimer44NMe, Triamide44, Triamide444 y Triamide343 que son más hidrófilos y no presentan un brazo lipofílico para el posible receptor, no fueron efectivos en estos ensayos. Estas observaciones sugieren que la afinidad por la membrana probablemente contribuya a la eficiencia de estos compuestos observada en los ensayos de transporte de poliaminas en el parásito.

Por otro lado, el conjugado Ant4 aumentó el efecto tripanocida del benznidazol por más de un orden de magnitud, lo que sugiere que el uso de un tratamiento combinado reduciría la dosis efectiva del benznidazol y limitaría sus efectos secundarios.

Todos estos resultados demuestran que Ant4 es un compuesto prometedor para ser evaluado en modelos murinos de infección aguda y crónica de la enfermedad de Chagas. Cabe destacar que Ant4 es muy soluble en medios acuosos y se predice una alta biodisponibilidad oral (absorción intestinal) del mismo y que no tiene una unión significativa a proteínas plasmáticas (Niemand *et al.*, 2013).

El conjugado de putrescina Ant4 es un punto de partida interesante para el diseño de nuevos inhibidores del transporte de poliaminas y de drogas para la enfermedad de Chagas. Además, considerando que este compuesto no se encuentra aprobado para su uso en humanos, estamos realizando la búsqueda, mediante simulaciones computacionales y ensayos *in vitro*, de análogos químicos de Ant4, con efectos biológicos similares, aprobados para su uso en humanos y reposicionados para su posible aplicación como drogas antichagásicas.

En la Figura 51 se resumen los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a los transportadores de poliaminas y a las drogas tripanocidas pentamidina, isotretinoína y Ant4, involucradas en la inhibición del transporte de dichos metabolitos de *T. cruzi*.

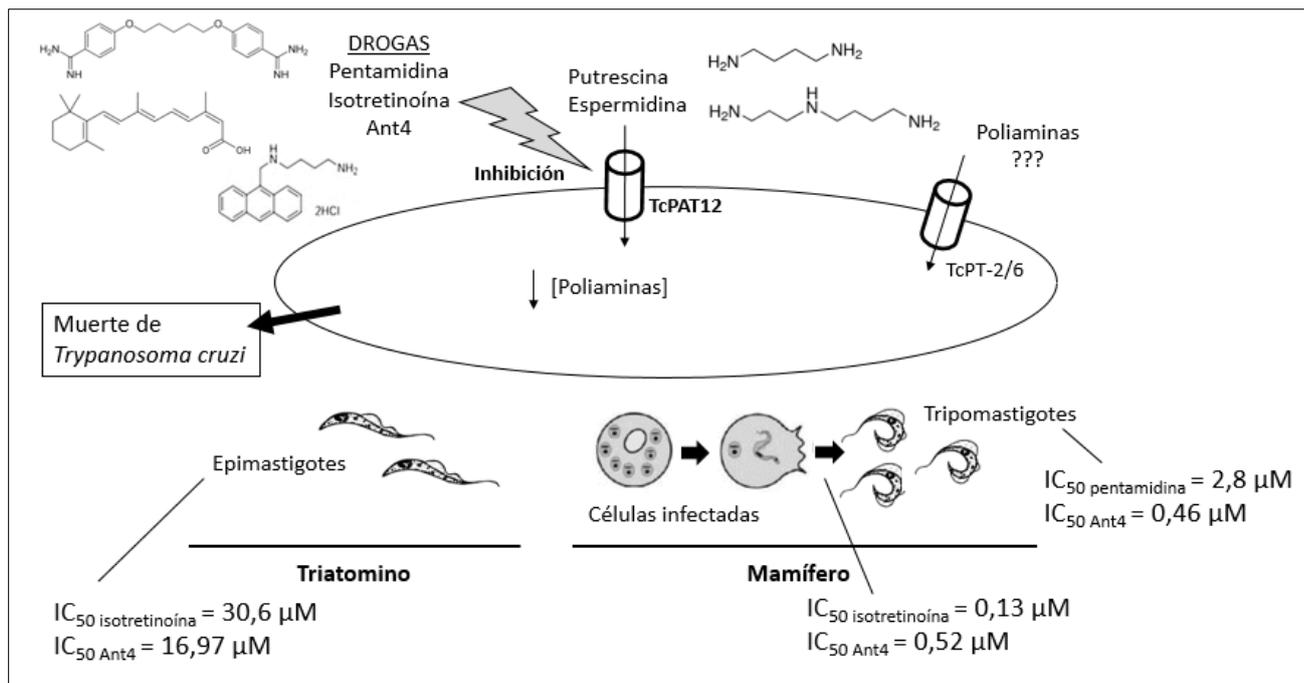


Figura 51. Esquema general de los resultados obtenidos en la presente tesis. Se continuó con la caracterización del TcPAT12 en epimastigotes de *T. cruzi* y se determinó que es un transportador de putrescina y espermidina. Se identificaron 5 genes que codifican para posibles permeasas de poliaminas en el genoma del parásito (TcPT-2/6). Sin embargo, la funcionalidad de estos genes todavía no se confirmó. Por otro lado, las drogas pentamidina e isotretinoína y el análogo de putrescina Ant4 inhibieron el transporte de poliaminas en *T. cruzi* y mostraron actividad tripanocida en los diferentes estadios del parásito (epimastigotes, tripomastigotes aislados y liberación de tripomastigotes).

VI-Conclusiones

Como objetivo general de este trabajo se propuso avanzar en la caracterización del transporte de poliaminas por TcPAT12 en *T. cruzi*, así como identificar nuevas moléculas que inhiban este proceso esencial para la supervivencia del parásito con potencial aplicación a la terapia de la enfermedad de Chagas.

Se demostró que el gen TcPAT12 codifica para un transportador de putrescina y espermidina. La sobre-expresión de la permeasa en epimastigotes de *T. cruzi* permitió confirmar que mayores niveles intracelulares de poliaminas ejercen un efecto protector ante diferentes situaciones de estrés generado por peróxido de hidrógeno y por las drogas utilizadas actualmente para tratar la enfermedad de Chagas, nifurtimox y benznidazol.

Se determinó la presencia de cinco posibles transportadores de poliaminas en el genoma de *T. cruzi*, denominados TcPT-2 al TcPT-6, aunque la funcionalidad de estos genes todavía no ha sido confirmada. Considerando que el transporte de poliaminas es esencial para el desarrollo del parásito, identificar otras proteínas que participen en el proceso permitirá encontrar nuevos blancos moleculares que podrían ser utilizados como estrategias para el desarrollo de nuevas moléculas tripanocidas.

Se identificaron diferentes inhibidores del transporte de poliaminas con actividad tripanocida. Se determinó que la pentamidina, una droga utilizada para tratar la leishmaniasis y la tripanosomiasis Africana, tiene efectos contra *T. cruzi*, tanto *in vitro* como *in vivo*, y probablemente estén relacionados en parte con su capacidad para inhibir el transporte de poliaminas. En función de los resultados obtenidos, se propone que la pentamidina podría presentar más de un mecanismo de acción; inhibe el transporte de dichas moléculas y actuaría además sobre blancos intracelulares. También se descubrió otra droga tripanocida denominada isotretinoína, usando el TcPAT12 como blanco para el reposicionamiento de drogas mediante la técnica de rastreo virtual seguido de ensayos experimentales. Se determinó que este fármaco, aprobado por la FDA para el tratamiento del acné, inhibe el transporte de putrescina además de otros transportadores de aminoácidos de la misma familia TcAAAP. Además, presenta una fuerte actividad tripanocida en tripomastigotes en concentraciones nanomolares, con un índice de selectividad muy alto, siendo el efecto de la isotretinoína en el estadio infectivo de mamíferos de aproximadamente tres órdenes de magnitud mayor que su efecto en células humanas. Por otro lado, se detectaron autofosomas y cuerpos apoptóticos como parte de los mecanismos de muerte inducidos por la droga, lo que sugiere que la inhibición de los transportadores por la isotretinoína causaría el agotamiento de los nutrientes desencadenando procesos autofágicos y apoptóticos.

Los resultados demuestran que la pentamidina y la isotretinoína son drogas prometedoras para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, y el uso extensivo de ambos compuestos en humanos ha llevado a un perfil clínico bien conocido siendo una gran ventaja sobre moléculas recién sintetizadas que requieren ensayos más exhaustivos antes de su uso clínico.

De los ocho análogos sintéticos de poliaminas, sólo los compuestos Ant4, Ant44 y AMXT 1501, diseñados para el tratamiento contra el cáncer, inhiben el transporte de poliaminas. Sin embargo, únicamente Ant4 presenta un potente efecto tripanocida con un índice de selectividad mayor a 10. Ant4 inhibe el transporte de poliaminas en epimastigotes y tripomastigotes presentando probablemente más de un mecanismo de acción. Actuaría a través de la inhibición de la incorporación de estos metabolitos y una vez transportado dentro del parásito podría tener un modo adicional de toxicidad generado por el grupo antraceno. Otra característica interesante de este análogo de putrescina es que puede mejorar el efecto del benznidazol sobre epimastigotes. En síntesis, estos resultados sugieren que Ant4 es un compuesto prometedor para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y demuestran que es posible diseñar análogos de poliaminas con actividad tripanocida.

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis han permitido profundizar el conocimiento sobre el transportador de poliaminas TcPAT12, presentando resultados que refuerzan la importancia de esta permeasa en la defensa de *T. cruzi* ante diversas condiciones desfavorables. Especialmente se ha demostrado que los transportadores de poliaminas pueden ser utilizados para vehicular compuestos tóxicos dentro del parásito y que el transporte de estos metabolitos constituye un blanco terapéutico prometedor para el desarrollo de nuevos tratamientos contra la enfermedad de Chagas.

VII-Bibliografía

- Aiyar, a (2000) 'The use of CLUSTAL W and CLUSTAL X for multiple sequence alignment.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 132, pp. 221–241. doi: 10.1385/1-59259-192-2:221.
- Alberca, L. N. *et al.* (2016) 'Discovery of novel polyamine analogs with anti-protozoal activity by computer guided drug repositioning', pp. 305–321. doi: 10.1007/s10822-016-9903-6.
- Alberca, L. N. *et al.* (2018) 'Cascade Ligand- and Structure-Based Virtual Screening to Identify New Trypanocidal Compounds Inhibiting Putrescine Uptake', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(May). doi: 10.3389/fcimb.2018.00173.
- Alcazar, R. and Tiburcio, A. F. (2014) 'Plant polyamines in stress and development: an emerging area of research in plant sciences', *Frontiers in Plant Science*, 5(July), pp. 1–2. doi: 10.3389/fpls.2014.00319.
- Allarakhia, M. (2013) 'Open-source approaches for the repurposing of existing or failed candidate drugs: Learning from and applying the lessons across diseases', *Drug Design, Development and Therapy*, 7, pp. 753–766. doi: 10.2147/DDDT.S46289.
- Almeida-de-Faria, M. *et al.* (1999) 'Trypanosoma cruzi: characterization of an intracellular epimastigote-like form.', *Experimental parasitology*, 92, pp. 263–274. doi: 10.1006/expr.1999.4423.
- Alvarez, V. E. *et al.* (2008) 'Blocking autophagy to prevent parasite differentiation: A possible new strategy for fighting parasitic infections?', *Autophagy*, 4(3), pp. 361–363. doi: 10.1074/jbc.M708474200.
- Andrews, K. T., Fisher, G. and Skinner-Adams, T. S. (2014) 'Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. Australian Society for Parasitology, 4(2), pp. 95–111. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.02.002.
- dos Anjos, D. O. *et al.* (2016) 'Effects of a novel β -lapachone derivative on Trypanosoma cruzi: Parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis', *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6(3), pp. 207–219. doi: 10.1016/j.ijpddr.2016.10.003.
- Antas, P. R. Z. *et al.* (1999) 'Early, intermediate, and late acute stages in Chagas' disease: A study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(2), pp. 308–314. doi: 10.4269/ajtmh.1999.61.308.
- Ariyanayagam, M. R. and Fairlamb, A. H. (1997) 'Diamine auxotrophy may be a universal feature of Trypanosoma cruzi epimastigotes', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 84(1), pp. 111–121. doi: 10.1016/S0166-6851(96)02788-0.
- Ariyanayagam, M. R. and Fairlamb, A. H. (2001) 'Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115(2), pp. 189–198. doi: 10.1016/S0166-6851(01)00285-7.
- Ariyanayagam, M. R., Tetaud, E. and Fairlamb, A. H. (1998) 'Diamine auxotrophy in a eukaryotic parasite', *Biochem Soc Trans*, 26(4), pp. 606–609. doi: 10.1042/bst0260606.
- Ashburn, T. T. and Thor, K. B. (2004) 'Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs', *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(8), pp. 673–683. doi: 10.1038/nrd1468.
- Bacchi, C. *et al.* (1980) 'Polyamine metabolism: A potential therapeutic target in trypanosomes', *Science*.
- Bachrach, U. (2005) 'Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules.', *Current protein & peptide science*, 6(6), pp. 559–66. doi: 10.2174/138920305774933240.
- Bahia, M. T. *et al.* (2014) 'Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), pp. 4362–4370. doi: 10.1128/AAC.02754-13.
- Bailey, T. L. *et al.* (2006) 'MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs', *Nucleic Acids*

Research, 34(WEB. SERV. ISS.), pp. 369–373. doi: 10.1093/nar/gkl198.

Bajorath, J. (2001) 'Selected concepts and investigations in compound classification, molecular descriptor analysis, and virtual screening', *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 41(2), pp. 233–245. doi: 10.1021/ci0001482.

Bajusz, D., Rácz, A. and Héberger, K. (2015) 'Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations?', *Journal of Cheminformatics*. *Journal of Cheminformatics*, 7(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s13321-015-0069-3.

Baker, N. *et al.* (2013) 'Drug resistance in African trypanosomiasis : the melarsoprol and pentamidine story', *Trends Parasitol*, 29(3). doi: 10.1016/j.pt.2012.12.005.Drug.

Balaña-Fouce, R., Ordóñez, D. and Alunda, J. (1989) 'Putrescine transport system in *Leishmania infantum* promastigotes', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 35(1), pp. 43–50. doi: 10.1016/0166-6851(89)90140-0.

Balcazar, D. E. *et al.* (2017) 'The superfamily keeps growing: Identification in trypanosomatids of RibJ, the first riboflavin transporter family in protists', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(4). doi: 10.1371/journal.pntd.0005513.

Baliani, A. *et al.* (2005) 'Design and synthesis of a series of melamine-based nitroheterocycles with activity against trypanosomatid parasites', *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(17), pp. 5570–5579. doi: 10.1021/jm050177+.

Barderi, P. *et al.* (1998) 'The NADP⁺-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: sequence, genomic organization and expression', *Biochem. J*, 330, pp. 951–958. doi: 10.1042/bj3300951.

Barrett, M. P. *et al.* (1998) 'Trypanosome glucose transporters', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 91(1), pp. 195–205. doi: 10.1016/S0166-6851(97)00192-8.

Barrett, M. P. *et al.* (2003) 'The trypanosomiasis', *The Lancet*, 362(9394), pp. 1469–1480. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14694-6.

Basselin, M., Lawrence, F. and Robert-Gero, M. (1996) 'Promastigotes and Axenic Amastigotes', *Biochemistry Journal*, 315 (Pt 2, pp. 631–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1217243&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Bastin, P. *et al.* (2000) 'Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle.', *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 2(15), pp. 1865–1874. doi: 10.1016/S1286-4579(00)01344-7.

Bayer-Santos, E. *et al.* (2012) 'Regulatory elements in the 3' untranslated region of the GP82 glycoprotein are responsible for its stage-specific expression in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes', *Acta Tropica*. Elsevier B.V., 123(3), pp. 230–233. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.03.014.

Bellera, C. L. *et al.* (2015) 'High-throughput drug repositioning for the discovery of new treatments for chagas disease', *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 15(3), pp. 182–193. Available at: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L604864896>.

Belting, M. *et al.* (2003) 'Glypican-1 is a vehicle for polyamine uptake in mammalian cells: A pivotal role for nitrosothiol-derived nitric oxide', *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), pp. 47181–47189. doi: 10.1074/jbc.M308325200.

Benkert, P., Biasini, M. and Schwede, T. (2011) 'Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models', *Bioinformatics*, 27(3), pp. 343–350. doi: 10.1093/bioinformatics/btq662.

Biederbick, A., Kern, H. F. and Elsässer, H. P. (1995) 'Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo

marker for autophagic vacuoles.', *Eur J Cell Biol.*, 66(1), pp. 3–14.

Birkholtz, L.-M. *et al.* (2011) 'Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities', *Biochemical Journal*, 438(2), pp. 229–244. doi: 10.1042/BJ20110362.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) 'A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA', *Nucleic Acids Research*, 7(6), pp. 1513–1523. doi: 10.1093/nar/7.6.1513.

Bitonti, a J., Dumont, J. a and McCann, P. P. (1986) 'Characterization of *Trypanosoma brucei brucei* S-adenosyl-L-methionine decarboxylase and its inhibition by Berenil, pentamidine and methylglyoxal bis(guanylhydrazone).', *The Biochemical journal*, 237(3), pp. 685–9. doi: 10.1042/bj2370685.

Bouvier, L. A. *et al.* (2004) 'Post genomic analysis of permeases from the amino acid/auxin family in protozoan parasites', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321(3), pp. 547–556. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.002.

Bouvier, L. A. *et al.* (2006) 'An expanded adenylate kinase gene family in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(6), pp. 913–921. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.02.013.

Branche, C. *et al.* (2006) 'Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 147(1), pp. 30–38. doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.01.005.

Brennan, A., Rico, E. and Michels, P. A. M. (2012) 'Autophagy in Trypanosomatids', *Cells*, 1(4), pp. 346–371. doi: 10.3390/cells1030346.

Brun, R. and Schönenberger (1979) 'Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication.', *Acta tropica*, 36(1979), pp. 289–292. doi: 10.5169/seals-312533.

Burns, M. R. *et al.* (2005) 'Lysine-spermine conjugates: Hydrophobic polyamine amides as potent lipopolysaccharide sequestrants', *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13(7), pp. 2523–2536. doi: 10.1016/j.bmc.2005.01.038.

Burns, M. R. *et al.* (2009) 'Lipophilic Lysine-Spermine Conjugates are Potent Polyamine Transport Inhibitors for use in Combination with a Polyamine Biosynthesis Inhibitor', 52(7), pp. 1983–1993. doi: 10.1037/a0017530.A.

Busch, W. and Saier, M. H. (2002) 'The Transporter Classification (TC) system, 2002', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37(5), pp. 287–337. doi: 10.1080/10409230290771528.

Canepa, G. E. *et al.* (2004) 'Biochemical characterization of a low-affinity arginine permease from the parasite *Trypanosoma cruzi*', *FEMS Microbiology Letters*, 236(1), pp. 79–84. doi: 10.1016/j.femsle.2004.05.021.

Canepa, G. E. *et al.* (2005) 'Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*', *FEMS Microbiology Letters*, 247(1), pp. 65–71. doi: 10.1016/j.femsle.2005.04.029.

Carrillo, C. *et al.* (1999) '*Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme', *FEBS Letters*, 454(3), pp. 192–196. doi: 10.1016/S0014-5793(99)00804-2.

Carrillo, C. *et al.* (2003) 'Lack of arginine decarboxylase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes', *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(5), pp. 312–316. doi: 10.1111/j.1550-7408.2003.tb00141.x.

Carrillo, C. *et al.* (2006) 'Molecular and functional characterization of a spermidine transporter (TcPAT12) from *Trypanosoma cruzi*', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(3), pp. 936–940. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.03.215.

Carrillo, C. *et al.* (2010) '*Trypanosoma cruzi* amino acid transporter TcAAAP411 mediates arginine uptake

in yeasts', *FEMS Microbiology Letters*, 306(2), pp. 97–102. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01936.x.

Carter, N. S. and Fairlamb, A. H. (1993) 'Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter', *Nature*, 361(6408), pp. 173–176. doi: 10.1038/361173a0.

Chagas, C. (1909) 'Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, pp. 159–218. doi: 10.1590/S0074-02761909000200008.

Chan-Bacab, M. J., Hernández-Núñez, E. and Navarrete-Vázquez, G. (2009) 'Nitazoxanide, tizoxanide and a new analogue [4-nitro-N-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)benzamide; NTB] inhibit the growth of kinetoplastid parasites (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*) in vitro', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(6), pp. 1292–1293. doi: 10.1093/jac/dkp117.

Chappuis, F. (2018) 'Oral fexinidazole for human African trypanosomiasis', *The Lancet*, 391(10116), pp. 100–102. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30019-9.

Chaudhary, K. and Roos, D. S. (2005) 'Protozoan genomics for drug discovery', *NATURE BIOTECHNOLOGY*, 23(9), pp. 1089–1091.

Chiari, E., Carlos Pinto Dias, J. and Andrade Chiari, C. (1989) 'Hemocultures for the Parasitological Diagnosis of Human Chronic Chagas' Disease', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 22(1), pp. 19–23.

Childs, A. C., Mehta, D. J. and Gerner, E. W. (2003) 'Polyamine-dependent gene expression', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(7), pp. 1394–1406. doi: 10.1007/s00018-003-2332-4.

Clayton, C. E. (2016) 'Gene expression in Kinetoplastids', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 32, pp. 46–51. doi: 10.1016/j.mib.2016.04.018.

Clayton, J. (2010a) 'Chagas disease 101', *Nature*, 465(7301 SUPPL.), pp. 2009–2010. doi: 10.1038/nature09220.

Clayton, J. (2010b) 'The promise of *T. cruzi* genomics', *Nature*, 465(7301 SUPPL.). doi: 10.1038/nature09225.

Coura, J. R. (2007) 'Chagas disease: what is known and what is needed--a background article.', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 Suppl(August), pp. 113–122. doi: 10.1590/S0074-02762007000900018.

Cribb, P. and Serra, E. (2009) 'One- and two-hybrid analysis of the interactions between components of the *Trypanosoma cruzi* spliced leader RNA gene promoter binding complex', *International Journal for Parasitology*. Australian Society for Parasitology Inc., 39(5), pp. 525–532. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.09.008.

Cupello, M. P. *et al.* (2011) 'The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters', *Acta Tropica*. Elsevier B.V., 120(3), pp. 211–218. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.08.011.

Cushion, M. T. and Walzer, P. D. (2009) 'Preclinical drug discovery for new anti-pneumocystis compounds.', *Current medicinal chemistry*, 16(20), pp. 2514–2530. doi: 10.2174/092986709788682038.

Daliry, A. *et al.* (2011) 'The trypanocidal activity of amidine compounds does not correlate with their binding affinity to *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), pp. 4765–4773. doi: 10.1128/AAC.00229-11.

Dever, T. E., Gutierrez, E. and Shin, B. S. (2014) 'The hypusine-containing translation factor eIF5A', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(5), pp. 413–425. doi: 10.3109/10409238.2014.939608.

Dietrich, R. C. *et al.* (2018) 'Identification of cisapride as new inhibitor of putrescine uptake in *Trypanosoma cruzi* by combined ligand- and structure-based virtual screening', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 149, pp. 22–29. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.02.006.

- Dipple, A. *et al.* (1971) 'Reaction of 7-Bromomethylbenz [a] anthracene with Nucleic Acids, Polynucleotides, and Nucleosides"', *BIOCHEMIST*, 10(23), pp. 4323–4330.
- Docampo, R. *et al.* (2005) 'Acidocalcisomes - Conserved from bacteria to man', *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), pp. 251–261. doi: 10.1038/nrmicro1097.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Wortley EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran AN, Wortman JR, Alsmark UC, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carl, H. N. (2005) 'Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa.', *Science*, 309(5733), pp. 404–9. doi: 10.1126/science.1115538.
- Ellman, G. L. (1959) 'Tissue Sulfhydryl Groups', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, pp. 70–77.
- Fairlamb, A. H. *et al.* (1985) 'Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids', *Science*, 227(4693), pp. 1485–7. doi: 10.1126/science.3883489.
- Fairlamb, A. H. and Cerami, A. (1992) 'Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida.', *Send to Annu Rev Microbiol.*, 46, pp. 695–729. doi: 10.1146/annurev.mi.46.100192.003403.
- Faundez, M. *et al.* (2005) 'Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), pp. 126–130. doi: 10.1128/AAC.49.1.126-130.2005.
- Fauro, R. *et al.* (2013) 'Use of clomipramine as chemotherapy of the chronic phase of Chagas disease', *Parasitology*, 140(7), pp. 917–927. doi: 10.1017/S0031182013000103.
- Ferreira, G. L., de Oliveira, M. T. and Andricopulo, A. D. (2016) 'Advances and Progress in Chagas Disease Drug Discovery', *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(20), pp. 2290–2302. doi: 10.2174/1568026616666160413124902.
- Ferreira, L. G. and Andricopulo, A. D. (2016) *Drug repositioning approaches to parasitic diseases: a medicinal chemistry perspective*, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.drudis.2016.06.021.
- Finley, R. W., Cooney, D. A. and Dvorak, J. A. (1988) 'Nucleoside uptake in *Trypanosoma cruzi*: analysis of a mutant resistant to tubercidin', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 31(2), pp. 133–140. doi: 10.1016/0166-6851(88)90164-8.
- Fiser, A. and Šali, A. (2003) 'MODELLER: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models', *Methods in Enzymology*, 374, pp. 461–491. doi: 10.1016/S0076-6879(03)74020-8.
- Fozard, J. R. *et al.* (1980) 'L-Ornithine decarboxylase: An essential role in early mammalian embryogenesis', *Science*.
- Franco, D. L. *et al.* (2002) 'Osmotic stress sensitizes naturally resistant cells to TNF- α -induced apoptosis', *Cell Death and Differentiation*, 9(10), pp. 1090–1098. doi: 10.1038/sj.cdd.4401074.
- De Freitas, J. M. *et al.* (2006) 'Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*', *PLoS Pathogens*, 2(3), pp. 0226–0235. doi: 10.1371/journal.ppat.0020024.
- Gamarnik, a and Frydman, R. B. (1991) 'Cadaverine, an Essential Diamine for the Normal Root Development of Germinating Soybean (*Glycine max*) Seeds.', *Plant physiology*, 97(2), pp. 778–85. doi: 10.1104/pp.97.2.778.
- Ganceviciene, R. and Zouboulis, C. C. (2010) 'Isotretinoin: State of the art treatment for acne vulgaris', *Expert Review of Dermatology*, 2(6), pp. 693–701. doi: 10.1586/17469872.2.6.693.
- Ghedin, E. *et al.* (2004) 'Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 134(2), pp. 183–191. doi: 10.1016/j.molbiopara.2003.11.012.
- Gómez Gutiérrez, A. and Monteón Padilla, V. M. (2008) 'Algunos aspectos de la organización y regulación

genética en *Trypanosoma cruzi*: El agente etiológico de la enfermedad de Chagas', *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3–4), pp. 103–118.

Gonzalez, J. L. *et al.* (2007) 'Synthesis and antiparasitic evaluation of bis-2,5-[4-guanidinophenyl]thiophenes', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42(4), pp. 552–557. doi: 10.1016/j.ejmech.2006.11.006.

Gourbal, B. *et al.* (2004) 'Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin', *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), pp. 31010–31017. doi: 10.1074/jbc.M403959200.

Ha, H. C. *et al.* (1998) 'The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(19), pp. 11140–11145. doi: 10.1073/pnas.95.19.11140.

Hall, B. S., Bot, C. and Wilkinson, S. R. (2011) 'Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites', *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), pp. 13088–13095. doi: 10.1074/jbc.M111.230847.

Hall, B. S. and Wilkinson, S. R. (2012) 'Activation of benzimidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), pp. 115–123. doi: 10.1128/AAC.05135-11.

Handa, A. K., Fatima, T. and Mattoo, A. K. (2018) 'Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease', *Frontiers in Chemistry*, 6(February), pp. 1–18. doi: 10.3389/fchem.2018.00010.

Hasne, M. *et al.* (2010) 'A high-affinity putrescine-cadaverine transporter from *Trypanosoma cruzi*', *Mol Microbiol*, 76(1), pp. 78–91. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07081.x.A.

Hasne, M. P. and Barrett, M. P. (2000) 'Drug uptake via nutrient transporters in *Trypanosoma brucei*', *Journal of Applied Microbiology*, 89(4), pp. 697–701. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.01168.x.

Hasne, M. P., Soysa, R. and Ullman, B. (2016) 'The *trypanosoma cruzi* diamine transporter is essential for robust infection of mammalian cells', *PLoS ONE*, 11(4), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0152715.

Hasne, M. P. and Ullman, B. (2005) 'Identification and characterization of a polyamine permease from the protozoan parasite *Leishmania major*', *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), pp. 15188–15194. doi: 10.1074/jbc.M411331200.

Hayes, C. *et al.* (2014) 'Polyamine-Blocking Therapy Reverses Immunosuppression in the Tumor Microenvironment', 55(20), pp. 6197–6214. doi: 10.1088/0031-9155/55/20/011.DigiWarp.

Hediger, M. a (1994) 'Structure, function and evolution of solute transporters in prokaryotes and eukaryotes.', *The Journal of experimental biology*, 196, pp. 15–49.

Henriques, C. *et al.* (2015) 'Identification and functional characterization of a novel arginine/ornithine transporter, a member of a cationic amino acid transporter subfamily in the *Trypanosoma cruzi* genome', *Parasites and Vectors*. Parasites & Vectors, 8(1), pp. 1–18. doi: 10.1186/s13071-015-0950-y.

Higgins, C. F. (1995) 'The ABC of Channel Regulation Minireview The ABC Transporter/Channel Superfamily', *Cell*, 82(1992), pp. 693–696. doi: 10.1016/0092-8674(95)90465-4.

Hunter, K. J., Quesne, S. A. L. and Fairlamb, A. H. (1994) 'Identification and Biosynthesis of N1,N9-Bis(Glutathionyl)Aminopropylcadaverine (Homotrypanothione) in *Trypanosoma Cruzi*', *European Journal of Biochemistry*, 226(3), pp. 1019–1027. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.t01-1-01019.x.

Huynh, C. *et al.* (2012) 'Heme uptake by *Leishmania amazonensis* is mediated by the transmembrane protein LHR1', *PLoS Pathogens*, 8(7), p. 36. doi: 10.1371/journal.ppat.1002795.

Igarashi, K. and Kashiwagi, K. (2015) 'Modulation of protein synthesis by polyamines', *IUBMB Life*, 67(3),

pp. 160–169. doi: 10.1002/iub.1363.

Inbar, E. *et al.* (2012) 'Lysine transporters in human trypanosomatid pathogens', *Amino Acids*, 42(1), pp. 347–360. doi: 10.1007/s00726-010-0812-z.

Inbar, E. *et al.* (2013) 'A versatile proline/alanine transporter in the unicellular pathogen *Leishmania donovani* regulates amino acid homeostasis and osmotic stress responses', *Biochemical Journal*, 449(2), pp. 555–566. doi: 10.1042/BJ20121262.

Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) 'High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids', *Gene*, 96(1), pp. 23–28. doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-P.

Ivens, A. C. *et al.* (2005) 'The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major* Alasdair', 309(5733), pp. 436–442.

Jackson, A. P. (2007) 'Origins of amino acid transporter loci in trypanosomatid parasites', *BMC Evolutionary Biology*, 7, pp. 1–17. doi: 10.1186/1471-2148-7-26.

Jagu, E. *et al.* (2017) 'Polyamine-based analogs and conjugates as antikinoplastid agents', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 139, pp. 982–1015. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.08.014.

Jimenez, V. *et al.* (2008) 'Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures', *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(3), pp. 688–698. doi: 10.1002/jcb.21864.

Jones, D., Taylor, W. and Thornton, J. (1992) 'The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences.', *Comput Appl Biosci.*, 8(3), pp. 275–282.

Kaur, G. and Rajput, B. (2014) 'Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin b, and pentamidine resistance in leishmania', *Journal of Parasitology Research*. Hindawi Publishing Corporation, 2014. doi: 10.1155/2014/726328.

Kelly, J. M. *et al.* (1992) 'A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*', *Nucleic Acids Research*, 20(15), pp. 3963–3969. doi: 10.1093/nar/20.15.3963.

Kleywegt, G. J. and Jones, T. A. (1996) 'Phi/Psi-chology: Ramachandran revisited', *Structure*, 4(12), pp. 1395–1400. doi: 10.1016/S0969-2126(96)00147-5.

de Koning, H. P. and Jarvis, S. M. (1999) 'Adenosine transporters in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*: substrate recognition motifs and affinity for trypanocidal drugs.', *Molecular pharmacology*, 56, pp. 1162–1170. doi: 10.1124/mol.56.6.1162.

Krauth-Siegel, R. L., Meiering, S. K. and Schmidt, H. (2003) 'The parasite-specific trypanothione metabolism of *trypanosoma* and *leishmania*', *Biological Chemistry*, 384(4), pp. 539–549. doi: 10.1515/BC.2003.062.

Kuan, L. *et al.* (2015) 'Dual AO/EB Staining to Detect Apoptosis in Osteosarcoma Cells Compared with Flow Cytometry', *Medical Science Monitor Basic Research*, 21, pp. 15–20. doi: 10.12659/MSMBR.893327.

Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) 'MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7 . 0 for Bigger Datasets', *Molecular Evolutionary Genetic Analysis*, 33(7), pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.

Kurihara, S. *et al.* (2013) 'Putrescine importer PlaP contributes to swarming motility and urothelial cell invasion in *Proteus mirabilis*', *Journal of Biological Chemistry*, 288(22), pp. 15668–15676. doi: 10.1074/jbc.M113.454090.

Laemmli (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 225, p. 846-847. Available at: <http://www.scielo.org.mx/pdf/reb/v33n2/v33n2a4.pdf>.

- Landfear, S. M. and Ignatushchenko, M. (2001) 'The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115(1), pp. 1–17. doi: 10.1016/S0166-6851(01)00262-6.
- Lara, F. A. *et al.* (2007) 'Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(1), pp. 16–22. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.238.
- Larsen, T. H. and Jemec, G. B. (2003) 'Acne: comparing hormonal approaches to antibiotics and isotretinoin', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 4(7), pp. 1097–1103. doi: 10.1517/14656566.4.7.1097.
- Lesnik, S. *et al.* (2015) 'LiSiCA: A Software for Ligand-Based Virtual Screening and Its Application for the Discovery of Butyrylcholinesterase Inhibitors', *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(8), pp. 1521–1528. doi: 10.1021/acs.jcim.5b00136.
- Levine, N. D. *et al.* (1980) 'A Newly Revised Classification of the Protozoa', *The Journal of Protozoology*, 27(1), pp. 37–58. doi: 10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x.
- Li, F. *et al.* (1996) 'Procyclic *Trypanosoma brucei* cell lines deficient in ornithine decarboxylase activity', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 78(1–2), pp. 227–236. doi: 10.1016/S0166-6851(96)02630-8.
- Liao, C. P. *et al.* (2009) 'Polyamine transport as a target for treatment of *Pneumocystis pneumonia*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), pp. 5259–5264. doi: 10.1128/AAC.00662-09.
- Liu, J.-H. *et al.* (2015) 'Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation', *Frontiers in Plant Science*, 6(October), pp. 1–10. doi: 10.3389/fpls.2015.00827.
- Lovell, S. C. *et al.* (2003) 'Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation', *Proteins-Structure Function and Genetics*, 50(August 2002), pp. 437–450. doi: 10.1002/prot.10286.
- Luk, G. D. and Casero, R. A. (1987) 'Polyamines in normal and cancer cells', *Adv Enzyme Regul*, 26, pp. 91–105. doi: 10.1016/0065-2571(87)90007-0.
- Luna, K. P. *et al.* (2009) 'In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole', 90, pp. 448–455.
- Macedo, A. M., Oliveira, R. P. and Pena, S. D. J. (2002) 'Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis.', *Expert reviews in molecular medicine*, 4(5), pp. 1–16. doi: 10.1017/S1462399402004118.
- Macedo, J. P. *et al.* (2017) 'Ornithine uptake and the modulation of drug sensitivity in *Trypanosoma brucei*', *FASEB Journal*, 31(10), pp. 4649–4660. doi: 10.1096/fj.201700311R.
- Magdaleno, A. *et al.* (2009) 'Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*', *PLoS ONE*, 4(2). doi: 10.1371/journal.pone.0004534.
- Mair, G. *et al.* (2000) 'A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA.', *RNA (New York, N.Y.)*, 6(2), pp. 163–9. doi: 10.1017/S135583820099229X.
- Marchese, L. *et al.* (2018) 'The Uptake and Metabolism of Amino Acids, and Their Unique Role in the Biology of Pathogenic Trypanosomatids', *Pathogens*, 7(2), p. 36. doi: 10.3390/pathogens7020036.
- Martínez-Calvillo, S. *et al.* (2010) 'Gene expression in trypanosomatid parasites', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. doi: 10.1155/2010/525241.
- Martins, R. M. *et al.* (2009) 'Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion', *Infection and Immunity*, 77(7), pp. 3023–3032. doi: 10.1128/IAI.00138-09.
- Mathieu, C. *et al.* (2014) '*Trypanosoma brucei* eflornithine transporter AAT6 is a low-affinity low-selective transporter for neutral amino acids', *Biochemical Journal*, 463(1), pp. 9–18. doi: 10.1042/BJ20140719.

- Maya, J. D. *et al.* (1997) 'Effects of Nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 86(1), pp. 101–106. doi: 10.1016/S0166-6851(96)02837-X.
- Maya, J. D. *et al.* (2007) 'Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host', *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 146(4), pp. 601–620. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.03.004.
- Mazareb, S., Fu, Z. Y. and Zilberstein, D. (1999) 'Developmental regulation of proline transport in *Leishmania donovani*', *Experimental Parasitology*, 91(4), pp. 341–348. doi: 10.1006/expr.1998.4391.
- Meier, A., Erler, H. and Beitz, E. (2018) 'Targeting Channels and Transporters in Protozoan Parasite Infections', *Frontiers in Chemistry*, 6(March). doi: 10.3389/fchem.2018.00088.
- Melnik, B. C. (2017) 'Apoptosis may explain the pharmacological mode of action and adverse effects of isotretinoin, including teratogenicity', *Acta Dermato-Venereologica*, 97(2), pp. 173–181. doi: 10.2340/00015555-2535.
- Merli, M. L. *et al.* (2016) 'The *Trypanosoma cruzi* Protein TcHTE Is Critical for Heme Uptake', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pntd.0004359.
- Michaeli, S. (2011) 'Trans-splicing in trypanosomes: Machinery and its impact on the parasite transcriptome', *Future Microbiology*, 6(4), pp. 459–474. doi: 10.2217/fmb.11.20.
- Miranda, M. R. *et al.* (2009) 'Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* arginine kinase', *Parasitology*, 136(10), pp. 1201–1207. doi: 10.1017/S0031182009990448.
- Miranda, M. R. *et al.* (2012) 'Cationic amino acid uptake constitutes a metabolic regulation mechanism and occurs in the flagellar pocket of *trypanosoma cruzi*', *PLoS ONE*, 7(2), pp. 3–9. doi: 10.1371/journal.pone.0032760.
- Molina, I. *et al.* (2014) 'Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease', *New England Journal of Medicine*, 370(20), pp. 1899–1908. doi: 10.1056/NEJMoa1313122.
- Morgan, D. M. L. (1998) *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY Polyamine Protocols*, Humana Press. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Morillo, C. A. *et al.* (2015) 'Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy', *New England Journal of Medicine*, 373(14), pp. 1295–1306. doi: 10.1056/NEJMoa1507574.
- Morillo, C. A. *et al.* (2017) 'Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers: The STOP-CHAGAS Trial', *Journal of the American College of Cardiology*, 69(8), pp. 939–947. doi: 10.1016/j.jacc.2016.12.023.
- Morris, G. and Huey, R. (2009) 'AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility', *Journal of ...*, 30(16), pp. 2785–2791. doi: 10.1002/jcc.21256.AutoDock4.
- Mosmann, T. (1983) 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays', *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), pp. 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Mukhopadhyay, R. and Madhubala, R. (1994) 'Effect of antioxidants on the growth and polyamine levels of *Leishmania donovani*', 47(4), pp. 611–645.
- Müller, S., Coombs, G. H. and Walter, R. D. (2001) 'Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy', *Trends in Parasitology*, 17(5), pp. 242–249. doi: 10.1016/S1471-4922(01)01908-0.
- Munday, J. C., Settimo, L. and de Koning, H. P. (2015) 'Transport proteins determine drug sensitivity and resistance in a protozoan parasite, *Trypanosoma brucei*', *Frontiers in Pharmacology*, 6(MAR), pp. 1–10. doi:

10.3389/fphar.2015.00032.

Muth, A. *et al.* (2013) 'Development of polyamine transport ligands with improved metabolic stability and selectivity against specific human cancers', *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(14), pp. 5819–5828. doi: 10.1021/jm400496a.

Muth, A. *et al.* (2014) 'Polyamine transport inhibitors: Design, synthesis, and combination therapies with difluoromethylornithine', *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(2), pp. 348–363. doi: 10.1021/jm401174a.

Navarrete-Vazquez, G. *et al.* (2011) 'Synthesis of benzologues of Nitazoxanide and Tizoxanide: A comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Elsevier Ltd, 21(10), pp. 3168–3171. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.02.100.

Niemand, J. *et al.* (2013) 'Anthracene-polyamine conjugates inhibit in vitro proliferation of intraerythrocytic plasmodium falciparum parasites', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), pp. 2874–2877. doi: 10.1128/AAC.00106-13.

Olmo, F. *et al.* (2013) 'Scorpiand-like azamacrocycles prevent the chronic establishment of Trypanosoma cruzi in a murine model', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 70, pp. 189–198. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.09.048.

Orfanos, C. E. and Zouboulis, C. C. (1998) 'Oral retinoids in the treatment of acne', *Expert Review of Dermatology*, 196, pp. 140–147. doi: 10.1586/17469872.1.1.173.

Page, R. D. M. (1996) 'Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers', *Bioinformatics*, 12(4), pp. 357–358. doi: 10.1093/bioinformatics/12.4.357.

Palmer, A. J. *et al.* (2009) 'A putrescine–anthracene conjugate: a paradigm for selective drug delivery', *Biochemical Journal*, 424(3), pp. 431–438. doi: 10.1042/BJ20090815.

Panagiotidis, C. A. *et al.* (1995) 'Polyamines alter sequence-specific DNA-protein interactions', *Nucleic Acids Research*, 23(10), pp. 1800–1809. doi: 10.1093/nar/23.10.1800.

Pegg, A. and Casero Jr., R. A. (2011) *Current Status of the Polyamine Research Field*. doi: 10.1007/978-1-61779-034-8.

Pegg, A. E. (2013) 'Toxicity of polyamines and their metabolic products', *Chemical Research in Toxicology*, 26(12), pp. 1782–1800. doi: 10.1021/tx400316s.

Pegg, A. E. (2016) 'Functions of polyamines in mammals', *Journal of Biological Chemistry*, 291(29), pp. 14904–14912. doi: 10.1074/jbc.R116.731661.

Pereira, C. A. *et al.* (1999) 'L-arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in Trypanosoma cruzi', *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(6), pp. 566–570. doi: 10.1111/j.1550-7408.1999.tb05132.x.

Pereira, C. A. *et al.* (2008) 'Trypanosoma cruzi: Transporte de metabolitos esenciales obtenidos del hospedador', *Medicina*, 68(5), pp. 398–404.

Pereira, C. A. and Silber, A. M. (2012) 'On the evolution of hexose transporters in Kinetoplastid protozoans', *PLoS ONE*, 7(5), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0036303.

Pérez-Molina, J. A. and Molina, I. (2018) 'Chagas disease', *The Lancet*, 391(10115), pp. 82–94. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4.

Pettersen, E. F. *et al.* (2004) 'UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis', *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), pp. 1605–1612. doi: 10.1002/jcc.20084.

Phanstiel IV, O., Kaur, N. and Delcros, J. G. (2007) 'Structure-activity investigations of polyamine-anthracene conjugates and their uptake via the polyamine transporter', *Amino Acids*, 33(2), pp. 305–313. doi:

10.1007/s00726-007-0527-y.

Phillips, M. A. (2018) 'Polyamines in protozoan pathogens', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.TM118.003342.

Phillips, M. A., Coffino, P. and Wang, C. C. (1987) 'Cloning and sequencing of the ornithine decarboxylase gene from *Trypanosoma brucei*. Implications for enzyme turnover and selective difluoromethylornithine inhibition', *Journal of Biological Chemistry*, 262(18), pp. 8721–8727.

Pinheiro, E. *et al.* (2017) 'Chagas disease: Review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(3), pp. 296–300. doi: 10.1590/0037-8682-0433-2016.

Le Quesne, S. A. and Fairlamb, A. H. (1996) 'Regulation of a high-affinity diamine transport system in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes', 486, pp. 481–486.

Rajão, M. A. *et al.* (2014) 'Unveiling Benzimidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*', *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55(4), pp. 309–321. doi: 10.1002/em.21839.

Ralston, K. S. and Hill, K. L. (2008) 'The flagellum of *Trypanosoma brucei*: New tricks from an old dog', *International Journal for Parasitology*, 38(8–9), pp. 869–884. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.03.003.

Ramsby, M. and Makowski, G. (2011) 'Differential detergent fractionation of eukaryotic cells', *Cold Spring Harbor Protocols*, 6(3). doi: 10.1101/pdb.prot5592.

Reddy, a S. *et al.* (2007) 'Virtual screening in drug discovery -- a computational perspective.', *Current protein & peptide science*, 8(4), pp. 329–51. doi: 10.2174/138920307781369427.

Reguera, R. *et al.* (1994) 'Putrescine uptake inhibition by aromatic diamidines in leishmania infantum promastigotes', *Biochemical Pharmacology*, 47(10), pp. 1859–1866. doi: 10.1016/0006-2952(94)90316-6.

Reizer, J. and Jrt, M. H. S. (1997) 'Modular multidomain phosphoryl transfer proteins of bacteria', *Curr Opin Struct Biol.*, (lic), pp. 407–415.

Reizer, J., Reizer, A. and Saier, M. H. (1994) 'A functional superfamily of sodium/solute symporters', *BBA - Reviews on Biomembranes*, 1197(2), pp. 133–166. doi: 10.1016/0304-4157(94)90003-5.

Rodriguez, R. *et al.* (1998) 'Homology modeling, model and software evaluation: Three related resources', *Bioinformatics*, 14(6), pp. 523–528. doi: 10.1093/bioinformatics/14.6.523.

Rohloff, P. and Docampo, R. (2008) 'A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*', *Exp Parasitol*, 6(1), pp. 247–253. doi: 10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x.Endothelial.

Rottenberg, M. E. *et al.* (1991) '[Immune response in *Trypanosoma cruzi* infection]', *Rev Argent Microbiol.*, 23(2), pp. 101–21.

Saier, M. H. (2000) 'A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(2), pp. 354–411. doi: 10.1128/MMBR.64.2.354-411.2000.

Saier, M. H. *et al.* (2016) 'The Transporter Classification Database (TCDB): Recent advances', *Nucleic Acids Research*, 44(D1), pp. D372–D379. doi: 10.1093/nar/gkv1103.

Sales Junior, P. A. *et al.* (2017) 'Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5), pp. 1289–1303. doi: 10.4269/ajtmh.16-0761.

Salvatella, R., Irabedra, P. and Castellanos, L. G. (2014) 'Interruption of vector transmission by native vectors and "the art of the possible"', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(1), pp. 122–130. doi:

10.1590/0074-0276140338.

Sánchez, C. P., González, N. S. and Algranati, I. D. (1989) 'Stable ornithine decarboxylase in promastigotes of *Leishmania mexicana*', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 161(2), pp. 754–761. doi: 10.1016/0006-291X(89)92664-8.

Sanchez, M. A. (2013) 'Molecular identification and characterization of an essential pyruvate transporter from *Trypanosoma brucei*', *Journal of Biological Chemistry*, 288(20), pp. 14428–14437. doi: 10.1074/jbc.M113.473157.

Saurin, W., Hofnung, M. and Dassa, E. (1999) 'Getting in or out: Early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters', *Journal of Molecular Evolution*, 48(1), pp. 22–41. doi: 10.1007/PL00006442.

Saye, M. *et al.* (2014) 'Proline modulates the *Trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-Proline transporter', *PLoS ONE*, 9(3). doi: 10.1371/journal.pone.0092028.

Sayé, M. *et al.* (2017) 'Evaluation of proline analogs as trypanocidal agents through the inhibition of a *Trypanosoma cruzi* proline transporter', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier, 1861(11), pp. 2913–2921. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.08.015.

Schnauffer, A., Domingo, G. J. and Stuart, K. (2002) 'Natural and induced dyskinetoplastic trypanosomatids: How to live without mitochondrial DNA', *International Journal for Parasitology*, 32(9), pp. 1071–1084. doi: 10.1016/S0020-7519(02)00020-6.

Schoijet, A. C., Sternlieb, T. and Alonso, G. D. (2017) 'The Phosphatidylinositol 3-kinase Class III Complex Containing TcVps15 and TcVps34 Participates in Autophagy in *Trypanosoma cruzi*', *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64(3), pp. 308–321. doi: 10.1111/jeu.12367.

Schuber, F. (1989) 'Influence of polyamines on membrane functions', *Biochemical Journal*, 260, pp. 1–10.

Schwede, T. *et al.* (2003) 'SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server', *Nucleic Acids Research*, 31(13), pp. 3381–3385. doi: 10.1093/nar/gkg520.

Seiler, N. (1996) 'Roles of polyamines in cell biology', *Principles of Medical Biology*, 4(PART 2), pp. 329–348. doi: 10.1016/S1569-2582(96)80100-0.

Seiler, N., Delcros, J. G. and Moulinoux, J. P. (1996) 'Polyamine transport in mammalian cells. An update', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, pp. 843–861. doi: 10.1016/1357-2725(96)00021-0.

Shaked-Mishan, P. *et al.* (2006) 'A novel high-affinity arginine transporter from the human parasitic protozoan *Leishmania donovani*', *Molecular Microbiology*, 60(1), pp. 30–38. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05060.x.

Siegel, T. N. *et al.* (2009) 'Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*', *Genes and Development*, 23(9), pp. 1063–1076. doi: 10.1101/gad.1790409.

Silber, A. M. *et al.* (2002) 'Active Transport of L-Proline in *Trypanosoma cruzi*', *J Eukaryot Microbiol*, 9.

Silber, A. M. *et al.* (2006) 'Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*', *International Journal for Parasitology*, 36(2), pp. 157–163. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.10.006.

Silva, C. F. *et al.* (2007) 'Activity of "reversed" diamidines against *Trypanosoma cruzi* "in vitro"', *Biochemical Pharmacology*, 73(12), pp. 1939–1946. doi: 10.1016/j.bcp.2007.03.020.

Simpson, A. G. B., Stevens, J. R. and Lukeš, J. (2006) 'The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates', *Trends in Parasitology*, 22(4), pp. 168–174. doi: 10.1016/j.pt.2006.02.006.

Simpson, L. *et al.* (2004) 'Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *Trypanosoma* involved

in U-insertion / deletion RNA editing Mitochondrial proteins and complexes in Leishmania and Trypanosoma involved in U-insertion / deletion RNA editing', *Rna*, 10(2), pp. 159–170. doi: 10.1261/rna.5170704.RNA.

Smith, T. A. (1975) 'Recent advances in the biochemistry of plant amines', *Phytochemistry*, 14(4), pp. 865–890. doi: 10.1016/0031-9422(75)85155-7.

Soksawatmaekhin, W. *et al.* (2004) 'Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*', *Molecular Microbiology*, 51(5), pp. 1401–1412. doi: 10.1046/j.1365-2958.2004.03913.x.

Soulet, D. *et al.* (2004) 'A fluorescent probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two-step mechanism', *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), pp. 49355–49366. doi: 10.1074/jbc.M401287200.

Sousa, F. S., Fernandes, P. A. and Ramos, M. J. (2006) 'Protein–Ligand Docking: Current Status and Future Challenges', *Proteins*, 65, pp. 15–26. doi: 10.1002/prot.

De Souza, W. (2002) 'Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*', *Current Pharmaceutical Design*, 8(4), pp. 269–285. doi: 10.2174/1381612023396276.

De Souza, W. (2009) 'Structural organization of *Trypanosoma cruzi*', *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, 104(May), pp. 89–100. doi: 10.1590/S0074-02762009000900014.

Soysa, R. *et al.* (2013) 'Structural Model of a Putrescine-Cadaverine Permease from *Trypanosoma cruzi* Predicts Residues Vital for Transport and Ligand Binding', 452(3), p. 423-. doi: 10.1042/BJ20130350.

Stewart, T. M. *et al.* (2018) 'Polyamine catabolism and oxidative damage.', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.TM118.003337.

Stuart, K. D. *et al.* (2005) 'Complex management: RNA editing in trypanosomes', *Trends in Biochemical Sciences*, 30(2), pp. 97–105. doi: 10.1016/j.tibs.2004.12.006.

Tabor, C. W. and Tabor, H. (1976) '1,4-Diaminobutane (Putrescine), Spermidine, and Spermine', *Annual Review of Biochemistry*, 45(1), pp. 285–306. doi: 10.1146/annurev.bi.45.070176.001441.

Takano, A., Kakehi, J. I. and Takahashi, T. (2012) 'Thermospermine is not a minor polyamine in the plant kingdom', *Plant and Cell Physiology*, 53(4), pp. 606–616. doi: 10.1093/pcp/pcs019.

Talevi, A. and Bruno-Blanch, L. E. (2009) 'Screening virtual: Una herramienta eficaz para el desarrollo de nuevos fármacos en Latinoamérica', *Latin American Journal of Pharmacy*, 28(1), pp. 141–150.

Tamura, K. *et al.* (2013) 'MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0', *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp. 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.

Taylor, M. C. and Kelly, J. M. (2010) 'Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection', *Parasitology*, 137(6), pp. 899–917. doi: 10.1017/S0031182009991880.

Tetaud, E. *et al.* (1997) 'Kinetoplastid glucose transporters.', *The Biochemical journal*, 325 (Pt 3, pp. 569–80. doi: 10.1042/bj3250569.

Tetaud, E. *et al.* (2000) 'Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*', *Microbiology*, 91(August 1994), pp. 8278–8282.

Thomas, T. *et al.* (1995) 'Polyamine-mediated conformational perturbations in DNA alter the binding of estrogen receptor to poly(dG-m5dC).poly(dG-m5dC) and a plasmid containing the estrogen response element', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 54(3–4), pp. 89–99. doi: 10.1016/0960-0760(95)00126-K.

Tomii, K. and Kanehisa, M. (1998) 'A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial

genomes', *Genome Research*, 8(10), pp. 1048–1059. doi: 10.1101/gr.8.10.1048.

Tonelli, R. R. *et al.* (2004) 'L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*.', *Cellular microbiology*, 6(8), pp. 733–41. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00397.x.

Torrice, F. *et al.* (2018) 'Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial', *The Lancet Infectious Diseases*, 18(4), pp. 419–430. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30538-8.

Trochine, A. *et al.* (2014) 'Benznidazole Biotransformation and Multiple Targets in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Metabolomics', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5). doi: 10.1371/journal.pntd.0002844.

Tsirigos, K. D. *et al.* (2015) 'The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides', *Nucleic Acids Research*, 43(W1), pp. W401–W407. doi: 10.1093/nar/gkv485.

Turrens, J. F. (2004) 'Oxidative stress and antioxidant defenses: A target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa', *Molecular Aspects of Medicine*, 25(1–2), pp. 211–220. doi: 10.1016/j.mam.2004.02.021.

Tyler, K. M. and Engman, D. M. (2001) 'The life cycle of *Trypanosoma cruzi*', *International Journal for Parasitology*, 31(5–6), pp. 472–481. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00153-9.

Urbina, J. A. (2010) 'Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches', *Acta Tropica*. Elsevier B.V., 115(1–2), pp. 55–68. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.10.023.

Urbina, J. A. (2015) 'Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: Advances, challenges and perspectives', *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(1), pp. 149–156. doi: 10.1111/jeu.12184.

Vazquez, M. P. and Levin, M. J. (1999) 'Functional analysis of the intergenic regions of TcP2 β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector', *Gene*, 239(2), pp. 217–225. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00386-8.

Veiga-Santos, P. *et al.* (2015) 'SQ109, a new drug lead for chagas disease', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), pp. 1950–1961. doi: 10.1128/AAC.03972-14.

Verrey, F. *et al.* (2004) 'CATs and HATs: The SLC7 family of amino acid transporters', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), pp. 532–542. doi: 10.1007/s00424-003-1086-z.

Vincent, I. M. *et al.* (2010) 'A molecular mechanism for eflornithine resistance in African trypanosomes', *PLoS Pathogens*, 6(11), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.ppat.1001204.

Wang, C., Delcros, J. G., *et al.* (2003) 'Defining the Molecular Requirements for the Selective Delivery of Polyamine Conjugates into Cells Containing Active Polyamine Transporters', *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(24), pp. 5129–5138. doi: 10.1021/jm030223a.

Wang, C., Delcros, J. G., *et al.* (2003) 'Synthesis and biological evaluation of N1-(anthracen-9-ylmethyl)triamines as molecular recognition elements for the polyamine transporter', *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(13), pp. 2663–2671. doi: 10.1021/jm030028w.

Wheeler, R. J., Gluenz, E. and Gull, K. (2013) 'The limits on trypanosomatid morphological diversity', *PLoS ONE*, 8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0079581.

Wiemer, E. a, Michels, P. A. M. and Opperdoes, F. R. (1995) 'The inhibition of pyruvate transport across the plasma membrane of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei* and its metabolic implications.', *The Biochemical journal*, 312 (Pt 2, pp. 479–484. doi: 10.1042/bj3120479.

Wilkinson, S. R. and Kelly, J. M. (2003) 'The Role of Glutathione Peroxidases in Trypanosomatids The Role of Glutathione Peroxidases in Trypanosomatids', 384(May), pp. 517–525. doi: 10.1515/BC.2003.060.

- Wilkinson, S. R. and Kelly, J. M. (2009) 'Trypanocidal drugs: Mechanisms, resistance and new targets', *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11(October 2009). doi: 10.1017/S1462399409001252.
- Willert, E. K. and Phillips, M. A. (2009) 'Cross-species activation of trypanosome S-adenosylmethionine decarboxylase by the regulatory subunit prozyme', *Mol Biochem Parasitol*, 6(1), pp. 247–253. doi: 10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x.Endothelial.
- Willert, E. and Phillips, M. A. (2012) 'Regulation and function of polyamines in African trypanosomes', *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd, 28(2), pp. 66–72. doi: 10.1016/j.pt.2011.11.001.
- World Health Organization (2002) 'Control of Chagas disease', *World Health Organization - Technical Report Series*, (905), pp. 1–99. doi: 10.1016/S0065-308X(05)61004-4.
- World Health Organization (2015) 'Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates', *Weekly Epidemiological Record*, (6), pp. 33–44. doi: 10.2147/IBPC.S70402.
- World Health Organization & Mundo Sano (2007) 'La Enfermedad de Chagas, a la puerta de os 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral', *La Enfermedad de Chagas, a la puerta de os 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral*.
- Yang, J. *et al.* (2014) 'The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction', *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 12(1), pp. 7–8. doi: 10.1038/nmeth.3213.
- Yorke, W. (1940) 'Recent work on the chemotherapy of protozoal infections', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(2).
- Young, G. B. *et al.* (1999) 'The amino acid/auxin: Proton symport permease family', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1415(2), pp. 306–322. doi: 10.1016/S0005-2736(98)00196-5.
- Zabala, J. P. (2009) 'Historia de la enfermedad de Chagas en Argentina: evolución conceptual, institucional y política', *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 16, pp. 57–74. doi: 10.1590/S0104-59702009000500004.
- Zingales, B. *et al.* (2009) 'A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific no- menclature: second revision meeting recommends TcI to Tc', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(November), pp. 1051–1054. doi: 10.1590/S0074-02762009000700021.

VIII-Anexos

Anexo 1

A.1.1. Curva de crecimiento de epimastigotes que sobre-expresan GFP en medio BHT

Con el objetivo de poder comparar las tasas de crecimiento de los parásitos en el medio semisintético SDM-79 (Figura 24) respecto al medio de cultivo rico BHT (medio normal de crecimiento), se llevó a cabo una curva de crecimiento estándar de epimastigotes sobre-expresando GFP en BHT (Figura A1).

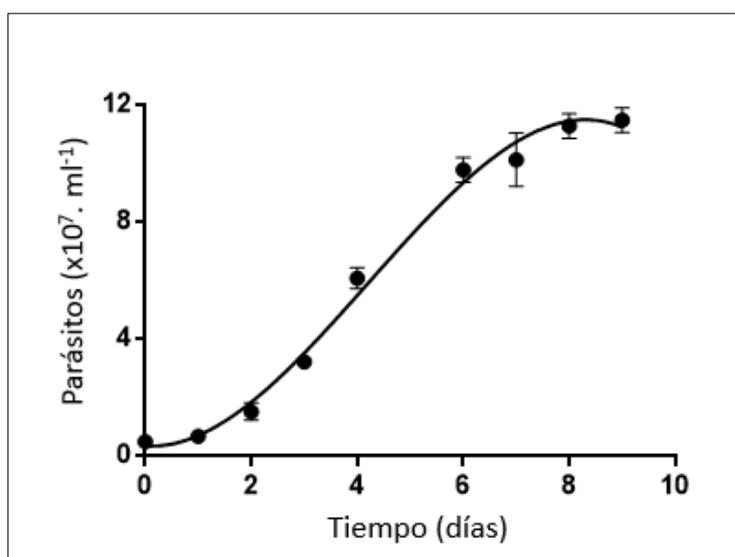


Figura A1. Curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* que sobre-expresan GFP. Para determinar la tasa de crecimiento, 10^6 parásitos/ml fueron cultivados en medio BHT y mantenidos a 28°C por 10 días. El crecimiento de los epimastigotes se evaluó periódicamente mediante el recuento de los mismos en cámara de Neubauer.

A.1.2. Sobre-expresión de TcPAT12 y resistencia a estrés generado por peróxido de hidrógeno y drogas tripanocidas

Las Figuras A2 y A3 muestran los efectos de las drogas tripanocidas nifurtimox y benznidazol y del peróxido de hidrógeno en el crecimiento de epimastigotes que sobre-expresan TcPAT12 y parásitos control que sobre-expresan GFP. Los valores de IC_{50} se calcularon usando regresiones no lineales a funciones logísticas de dosis-respuesta. Las curvas de IC_{50} se compararon con la prueba F de Fisher (Figura A2, $p=0,0064$ y Figura A3, $p=0,0001$). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism v.6.

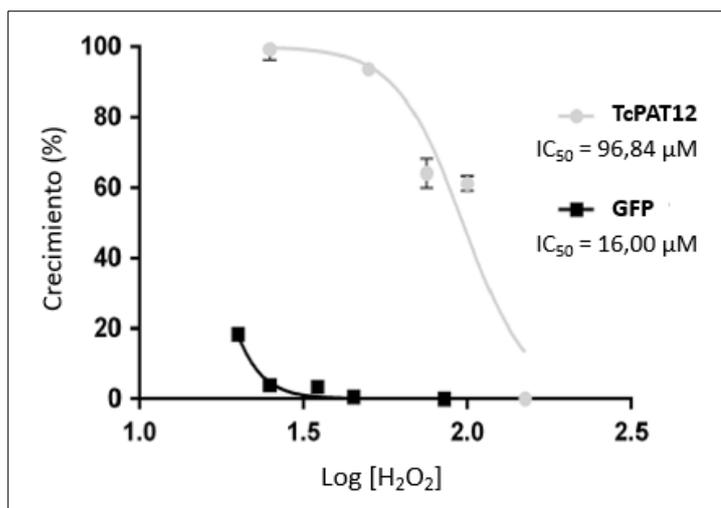


Figura A2. Resistencia a estrés oxidativo en epimastigotes que sobre-expresan TcPAT12 y parásitos control que sobre-expresan GFP. Alrededor de $1,3 \times 10^6$ parásitos $\cdot \text{ml}^{-1}$ (TcPAT12, línea gris; GFP, línea negra) fueron incubados con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con concentraciones de 0 a $150 \mu\text{M}$. Las células fueron contadas después de 24 horas de tratamiento. La densidad celular está expresada como el porcentaje respecto del control sin tratamiento (TcPAT12, $1,4 \times 10^6$ células/ml; GFP, $6,2 \times 10^6$ células/ml).

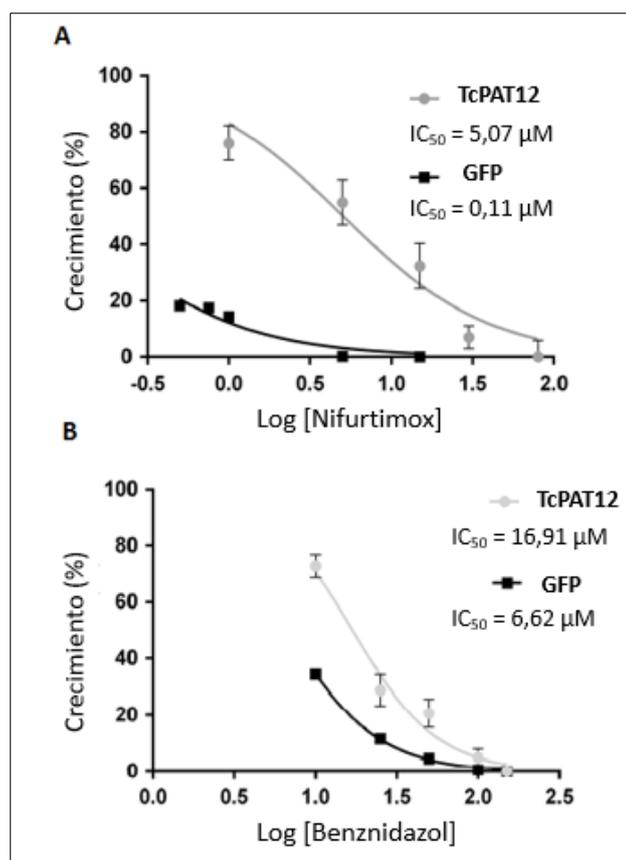


Figura A3. Efecto de las drogas tripanocidas nifurtimox y benznidazol en el crecimiento de epimastigotes TcPAT12 y del control GFP. Alrededor de $1,3 \times 10^6$ parásitos $\cdot \text{ml}^{-1}$ (TcPAT12, línea gris; GFP, línea negra) fueron tratados con concentraciones crecientes de las drogas nifurtimox (A) (0-80 μM) y benznidazol (B) (0-150 μM) y contados a las 24 horas post-tratamiento. La densidad celular está expresada como el porcentaje respecto del control sin tratamiento (nifurtimox: TcPAT12, $1,48 \times 10^6$ células/ml; GFP, $6,02 \times 10^6$ células/ml y benznidazol: TcPAT12, $2,6 \times 10^6$ células/ml; GFP, $34,2 \times 10^6$ células/ml).

Anexo 2

A.2 Matriz de similitud basada en el coeficiente de Tanimoto

Todos los compuestos (C1-C10) obtenidos a partir de la primera etapa de rastreo virtual se usaron para construir una matriz de similitud (Figura A4). Los valores indicados se calcularon en función del coeficiente de Tanimoto (definido en la sección de materiales y métodos) comparando cada conjunto de puntuación (*score*) de similitud. El nombre de cada compuesto se indica en la Tabla 6 de Resultados.

La matriz permite medir las similitudes entre pares de compuestos. Las similitudes están acotadas en el rango cero a uno; un aumento de la similitud implica un aumento de la semejanza entre compuestos, y toda similitud de un compuesto consigo mismo debería ser igual al máximo valor posible, es decir, uno.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
C1	1	0,84	0,85	0,84	0,8	0,8	0,84	0,66	0,13	0,15
C2	0,84	1	0,71	1	0,95	0,95	1	0,77	0,14	0,17
C3	0,85	0,71	1	0,71	0,74	0,74	0,71	0,79	0,13	0,14
C4	0,84	1	0,71	1	0,95	0,95	1	0,77	0,14	0,17
C5	0,8	0,95	0,74	0,95	1	1	0,95	0,8	0,15	0,17
C6	0,8	0,95	0,74	0,95	1	1	0,95	0,8	0,15	0,17
C7	0,84	1	0,71	1	0,95	0,95	1	0,77	0,14	0,17
C8	0,66	0,77	0,79	0,77	0,8	0,8	0,77	1	0,13	0,15
C9	0,13	0,14	0,13	0,14	0,15	0,15	0,14	0,13	1	0,45
C10	0,15	0,17	0,14	0,17	0,17	0,17	0,17	0,15	0,45	1

Figura A4. Matriz de similitud basada en el coeficiente de Tanimoto.

Anexo 3

A.3 Difusión de los resultados

Publicaciones científicas que han incluido resultados de esta tesis:

- Díaz MV, Miranda MR, Campos-Estrada C, **Reigada C**, Maya JD, Pereira CA, López-Muñoz R. Pentamidine exerts *in vitro* and *in vivo* anti *Trypanosoma cruzi* activity and inhibits the polyamine transport in *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*. Junio **2014** 134: 1-9. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.02.012.
- **Reigada C**, Sayé M, Vera EV, Balcazar D, Fraccaroli L, Carrillo C, Miranda MR, Pereira CA. *Trypanosoma cruzi* Polyamine Transporter: Its Role on Parasite Growth and Survival Under Stress Conditions. *The Journal of membrane biology*. Agosto **2016** 249(4): 475-81. doi: 10.1007/s00232-016-9888-z.
- Seguel V, Castro L, **Reigada C**, Cortes L, Díaz MV, Miranda MR, Pereira CA, Lapier M, Campos-Estrada C, Morello A, Kemmerling U, Maya JD, López-Muñoz R. Pentamidine antagonizes the benznidazole's effect *in vitro*, and lacks of synergy *in vivo*: Implications about the polyamine transport as an anti-*Trypanosoma cruzi* target. *Experimental parasitology*. Diciembre **2016** 171: 23-32. doi: 10.1016/j.exppara.2016.10.007.
- **Reigada C**, Valera-Vera EA, Sayé M, Errasti AE, Avila CC, Miranda MR, Pereira CA. Trypanocidal Effect of Isotretinoin through the Inhibition of Polyamine and Amino Acid Transporters in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Neglected tropical diseases*. Marzo **2017** 11(3):e0005472. doi: 10.1371/journal.pntd.0005472.
- **Reigada C**, Phanstiel O 4th, Miranda MR, Pereira CA. Targeting polyamine transport in *Trypanosoma cruzi*. *European journal of medicinal chemistry*. Marzo **2018** 147:1-6. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.01.083.