



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL CON MOLECULAS DE NUEVA SINTESIS  
FRENTE A LA LEISHMANIOSIS VISCERAL Y LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

El Director

Prof. Dr. D. ANTONIO OSUNA  
CARRILLO DE ALBORNOZ

La Tutora

Prof. Dra. Dña. JOSEFA L.  
SEGOVIA PARRA

Tesis Presentada para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas, por el

Licenciado JUAN JOSE CASTILLA CALVENTE.

Granada, Abril de 1994.

Los trabajos de investigación que se incluyen en la presente Memoria titulada "QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL CON MOLECULAS DE NUEVA SINTESIS FRENTE A LA LEISHMANIOSIS VISCERAL Y LA ENFERMEDAD DE CHAGAS", han sido realizados en el Laboratorio del Departamento de Parasitología y en el seno del Grupo de Investigación en Bioquímica y Parasitología molecular de la Universidad de Granada, bajo la tutoría de la Doctora Dña. Josefa L. Segovia Parra y la Dirección del Dr. D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz.

Granada, Abril de 1994.

LA DIRECTORA DEL GRUPO DE INVESTIGACION

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carmen', is written over a large, stylized, horizontal oval shape that serves as a decorative underline or flourish.

Fdo. Dña. CARMEN MASCARO LAZCANO.

## **1.-INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.**

## 1.- INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.

*Trypanosoma cruzi* y *Leishmania donovani* son los agentes etiológicos de la enfermedad de Chagas y de la leishmaniosis visceral respectivamente; enfermedades estas que originan importantes problemas de salud pública, siendo insuficientes los esfuerzos que se están haciendo para combatirlas. La amplia diversidad tanto de las formas clínicas de dichas enfermedades como de las situaciones epidemiológicas, obliga a aplicar en cada foco principios y métodos de lucha específicos. Además, la lucha contra estas enfermedades suele estar obstaculizada por la ignorancia de la verdadera prevalencia de las mismas, por la subestimación de los sufrimientos e incapacidades que causan en el hombre, y por el hecho de que los países en los que suelen ser un gravísimo problema se corresponden normalmente con zonas del Tercer Mundo, en las que los niveles económicos, culturales y de medios en investigación son muy limitados. Así mismo, el olvido que han sufrido estas enfermedades por las grandes empresas de investigación farmacéutica, motivada fundamentalmente por motivos económicos, y el desinterés o incapacidad que tienen los gobiernos y la sociedad desarrollada en general por las mismas, a diferencia de por otras; contribuye a que el avance en la erradicación de las mismas sea más lento que en el caso de otras enfermedades de mayor concienciación ciudadana.

En el presente trabajo hemos pretendido profundizar en la investigación relativa a obtener una quimioterapia eficaz y definitiva contra estas enfermedades, mediante el ensayo de una serie de moléculas de nueva síntesis. Los resultados de la presente memoria se enmarcan en un proyecto en el que están inmersos diferentes laboratorios de investigación, esperando que las aportaciones del trabajo conjunto permita la obtención de fármacos eficaces.

### 1.A.- *Trypanosoma cruzi*.

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo hematozoario parásito, que utiliza como hospedadores intermediarios a numerosas especies de hemípteros hematófagos pertenecientes a la familia *Reduviidae*.

Es el agente causal de la Tripanosomiasis Americana o "enfermedad de Chagas", la endemia más extendida del continente americano y que representa el mayor problema de salud pública en América Central y América del Sur.

#### 1.A.1.- Ciclo biológico.

El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* consta de dos etapas claramente definidas: una en el hospedador intermediario y vector, y otra en el hombre o en otros mamíferos salvajes o domésticos, que actúan como reservorios.

Los hemípteros reduvidos hematófagos de la subfamilia *Triatominae* son los hospedadores intermediarios y vectores naturales de *Trypanosoma cruzi*. El area geográfica de estas chinches se extiende desde, aproximadamente, 42° de latitud Norte en los Estados Unidos hasta 43° de latitud Sur en Argentina. Las especies transmisoras más importantes son:

- Triatoma infestans* en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Perú.
- Pastrongylus megistus* en Centro y Este de Brasil.
- Rhodnius prolixus* en Colombia, Ecuador y Venezuela.

Estos triatómidos son nocturnos, ocultándose durante el día y saliendo de noche para alimentarse. Las chinches ingieren *Trypanosoma cruzi* cuando se alimenta de un mamífero parasitado. En su interior y a lo largo del tubo digestivo, el parásito sufre una serie de transformaciones, encontrándosele en el intestino medio bajo la forma epimastigota, la cual se multiplica activamente, y en el recto como formas metacíclicas infectantes.

Estas últimas salen al exterior con las heces del insecto al defecar sobre el mamífero del que se alimenta, y penetran en el hospedador vertebrado por cualquier punto de discontinuidad de la piel.

Dentro del mamífero, las formas metacíclicas invaden las células próximas al punto de penetración, donde se transforman en formas amastigotas que se reproducen activamente.

Cuando el citoplasma celular está repleto de formas amastigotas, éstas se transforman en tripomastigotas; la célula hospedadora se rompe liberando las formas tripomastigotas, las cuales pasan al torrente circulatorio para, desde aquí, invadir otras nuevas células.

### 1.A.2.-Morfología de *Trypanosoma cruzi*.

*Trypanosoma cruzi* es un flagelado polimórfico que, dependiendo del tipo de hospedador y de su localización en el mismo, puede presentar distintos aspectos morfológicos (Hoare, 1972).

Cada una de las formas adoptadas por este parásito tiene sus propias peculiaridades que resumidamente son:

-Formas tripomastigotas sanguíneas: se encuentran en el torrente circulatorio de los mamíferos parasitados. Son formas alargadas de 10 a 25 micras de largo y de 1 a 5 micras de ancho. El cuerpo adopta, generalmente, la forma de "S" o de "C". Presentan un kinetoplasto grande, redondo o puntiagudo, situado a poca distancia del extremo posterior. Desde el kinetoplasto parte un flagelo que forma una membrana ondulante poco plegada, quedando libre un tercio de su longitud total. El núcleo ocupa aproximadamente un tercio del cuerpo.

-Formas amastigotas: al penetrar las formas tripomastigotas en el interior de las células del hospedador vertebrado, sufren una reorganización estructural dando lugar a las formas amastigotas. Son formas ovoides que miden aproximadamente 4 micras de diámetro mayor. El kinetoplasto es grande y muy compacto, con forma bacilar y situado excéntricamente en el citoplasma. Tras un periodo de reposo de 36 horas se dividen por fisión binaria.

-Formas epimastigotas: estas formas presentan un flagelo libre bastante largo, un cuerpo más grande que el de las formas tripomastigotas, kinetoplasto situado cerca del núcleo y una membrana ondulante corta. Son formas que se reproducen por bipartición longitudinal a lo largo del aparato digestivo del hospedador intermediario de forma muy activa.

-Formas tripomastigotas metacíclicas o metatripomastigotas: son formas que se localizan en el extremo posterior del intestino del insecto hematófago, a partir de una transformación de las formas epimastigotas. Son formas más alargadas que las tripomastigotas sanguíneas, miden aproximadamente 17 micras de largo. El Kinetoplasto es grande, redondo y se encuentra próximo al extremo posterior. El núcleo es alargado y no muy bien definido. La membrana ondulante es estrecha y posee un corto flagelo libre. Son formas que presentan una gran capacidad invasiva en las células nucleadas de las mucosas y conjuntiva.

### 1.A.3.- Ultraestructura de *Trypanosoma cruzi*.

En este apartado tratamos de describir los orgánulos más característicos y significativos de la estructura de este trypanosomátido.

La membrana celular: de consistencia y elasticidad suficiente para mantener la forma del parásito y al mismo tiempo, permitir gran flexibilidad en sus movimientos. Está constituida, como en cualquier otra célula, por una membrana unidad de 7.5 nm de espesor. A unos 12 nm al interior del protozoo, se sitúa una malla de microtúbulos, separados unos de otros 60 nm y dispuestos paralelamente a lo largo del eje mayor de la célula. Parecen ser estructuras de sustentación. Existen estudios que sugieren el hecho, que los microtúbulos intervienen probablemente en los procesos de transformación de una fase a otra (De Souza, 1976), habiéndose demostrado también como los microtúbulos son indisociables de la membrana. Meyer y De Souza (1976) observan que las formas tripomastigotas poseen menor densidad por  $\mu^2$  de microtúbulos en los dos extremos del protozoo, al igual que ocurre en otros trypanosomátidos.

El flagelo, tiene estructura similar a la de los demás organismos que lo poseen, es decir, posee 9 pares de túbulos interconectados paralelos al eje del flagelo; más 2 túbulos centrales. Todos se encuentran insertos en una matriz citoplasmática y la membrana celular envuelve enteramente al flagelo formando la vaina flagelar. Como un manguito, acompañando al axonema, se encuentra la cuerda paraxial. En la región de donde arranca el flagelo, la membrana citoplasmática sufre una invaginación formando la bolsa flagelar, arrancando éste del kinetosoma de características similares a un centriolo.

La mitocondria, presenta formaciones tubulares ramificadas y con paredes irregulares, exhibiendo en la parte interna, un número relativamente pequeño de crestas, dependiendo de la fase del parásito el número de crestas por unidad de mitocondria varía.

El kinetoplasto es el orgánulo más característico del orden *Kinetoplastida*. Delain y Riou (1969), han estudiado ampliamente su estructura. Estos autores, indican que el kinetoplasto es un disco arqueado compuesto en su mayor parte de moléculas minicirculares de ADN, de 0.45  $\mu\text{m}$  de perímetro, con forma de "8" y dispuestas paralelamente dando sensación de doble hilera. Los minicírculos pueden estar aislados o formando cadenas, incluso fusionados dando oligómeros.

El kinetoplasto contiene gran cantidad de ADN, de un 20 a un 25 % del total del ADN celular. El orgánulo está situado entre el núcleo y el flagelo, formando parte de un ensanchamiento de la mitocondria, pudiendo observarse las crestas mitocondriales en el kinetoplasto. El espesor de éste es de unos 0.16  $\mu\text{m}$  y la longitud de 1 a 1.5  $\mu\text{m}$ .

El kinetoplasto de las formas sanguíneas, contiene 3 o 4 filas de minicírculos de ADN, mientras que las otras formas, sólo tienen una doble fila, así como en las formas sanguíneas existe proporcionalmente más ADN en su kinetoplasto (Riou y Gutteridge, 1978).

De Souza y Chiari (1977), describieron como el kinetoplasto de las formas tripomastigotas es esférico, menos electrodensito que el de las formas epimastigotas y los filamentos de ADN más dispersos y largos pero ordenados a lo largo del eje mayor de la célula.

León y col. (1980), pusieron de manifiesto que el ADN del kinetoplasto está formado por un número aproximado de  $10^4$  minicírculos de  $0.45 \mu\text{m}$  de perímetro y por unos 50 maxicírculos de  $10 \mu\text{m}$  de perímetro, así como por cadenas lineales de distinto tamaño.

En el citoplasma los epimastigotes y tripomastigotes tienen gran cantidad de vesículas y estructuras multivesiculares, más abundantes en las formas epimastigotas (De Souza y col., 1975). De Souza y col., en 1978 sugieren que las vesículas pueden tener un papel importante en el acúmulo de proteínas.

Milder y Deane (1969), demuestran que las formas epimastigotas y amastigotas presentan citostoma, formado por una invaginación de la membrana citoplasmática en la bolsa flagelar, al que se vierten multitud de vesículas procedentes del aparato de Golgi.

#### **1.A.4.- Bioquímica de *Trypanosoma cruzi*.**

Las diferencias básicas entre el metabolismo de *T. cruzi* y el de las células de mamíferos pueden resumirse haciendo referencia a las cuatro áreas principales de la bioquímica del parásito: metabolismo energético y glucídico, metabolismo de ácidos nucleicos, metabolismo proteico y metabolismo lipídico.

##### **1.A.4.A.- Metabolismo energético y glucídico.**

Todas las formas de *T. cruzi* parecen presentar reservas de energía endógena, una ruta glucolítica, la ruta de las pentosas fosfato, un ciclo de los ácidos tricarbónicos, una cadena respiratoria que contienen citocromos y rutas del catabolismo oxidativo de aminoácidos tales como la prolina y la leucina; y de ácidos grasos tales como el palmitato.

La naturaleza de las reservas endógenas no se conoce con exactitud, pero parece ser



que son catabolizadas completamente hasta  $\text{CO}_2$ . Los azúcares, aminoácidos y ácidos grasos pueden servir como fuentes de energía adicionales o alternativas y son también degradadas casi en su totalidad a  $\text{CO}_2$ . Sin embargo también se forman otros productos tales como el lactato (posiblemente en formas sanguíneas solamente), acetato y succinato.

Los piridín-nucleótidos existentes en estado reducido son oxidados en orden de importancia por la cadena respiratoria: la fumarato reductasa, la NADH oxidasa y la lactato deshidrogenasa. El ATP se sintetiza tanto a nivel de sustrato como a nivel de la cadena respiratoria, mediante reacciones de fosforilación.

Por consiguiente el metabolismo energético y glucídico de *T. cruzi*, es básicamente el mismo que en células de mamífero. De cualquier forma las siguientes observaciones son de indudable relevancia en relación con la quimioterapia:

1.- La reserva primaria de energía endógena no es el glucógeno (ni cualquier otro alfa 1-4 polímero de la D-Glucosa) como ocurre en el mamífero. Más bien serán compuestos de naturaleza lipídica o proteica, que constituyen reservorios secundarios en el mamífero, los principales encargados del suministro energético, aunque ésta posibilidad aún no ha sido comprobada (Gutteridge y col. 1978).

2.- La glucosa no es necesariamente el mayor sustrato exógeno para el metabolismo energético como lo es en el mamífero. Esta área del metabolismo es bastante difícil de investigar en la mayoría de las cepas de *T. cruzi*, como consecuencia de las elevadas velocidades del metabolismo endógeno. Sin embargo, existen pruebas que indican una utilización (Wood, 1975; Sylvester y Krassner, 1976) de aminoácidos y ácidos grasos, aunque la contribución de estos últimos quizás no tenga importancia desde un punto de vista cuantitativo.

3.- Puede que la ruta de las pentosas fosfato sea funcional en algunas cepas actuando como alternativa a la ruta glucolítica, situación que no se da en mamíferos (Mancilla y Naquira, 1964), y que ocurre fundamentalmente en las formas epimastigotas (Adroher y col., 1990).

4.- Es muy probable que existan dos oxidasas terminales en la cadena respiratoria: un citocromo  $a+a_3$  CN<sup>-</sup>sensible y un citocromo CN<sup>-</sup>insensible parecido al citocromo O. Esto sugiere que o bien la cadena está ramificada o bien está constituida por dos cadenas paralelas. En células de mamífero sólo existe el citocromo  $a+a_3$  (Rogerson y Gutteridge, 1977).

5.- La cadena respiratoria en *T. cruzi* contiene un citocromo c que se diferencia del citocromo c de mamíferos en la longitud de onda del máximo de absorción alfa de la forma reducida (Hill, 1971).

6.- La cadena respiratoria de *T. cruzi* parece ser bastante ineficaz siendo suplementada por:

a) Rutas conducentes a la formación de lactato (probablemente tan sólo en formas sanguíneas y de forma semejante a lo que ocurre en mamíferos) y succinato, que por tanto actuaría como sumidero de electrones (Bowman, 1974). La formación de este último podría implicar a la fumarato reductasa, enzima ausente en mamíferos pero que en helmintos es posiblemente el blanco de numerosas drogas antihelmínticas (Van Den Bossche, 1976).

b) Una actividad NADH oxidasa que parece ser independiente de la cadena respiratoria, aunque ésta última alternativa podría ser un artefacto producido en la preparación de fracciones mitocondriales (Rogerson y Gutteridge, 1977).

7.- En *T. brucei*, la oxidación del alfa-glicerolfosfato está mediada por una enzima constituida por al menos dos componentes, una deshidrogenasa suramin-sensible y una oxidasa CN-insensible y SHAM-sensible. La actividad alfa-glicerolfosfato oxidasa también se ha puesto de manifiesto en *T. cruzi*. En este caso el componente oxidasa es SHAM-insensible pero CN-sensible y quizá sea un componente de la cadena respiratoria. Por otra parte el componente deshidrogenasa es suramín-sensible y por tanto podría representar un blanco potencial para el ataque de drogas (Gutteridge y Roberson, 1978).

8.- Las formas epimastigotas en cultivo contienen al menos una actividad glutamato deshidrogenasa que probablemente juega un papel en el catabolismo de aminoácidos y que presenta propiedades distintas a las de células de mamíferos (Cazzulo, 1977).

#### 1.A.4.B.- Compartimentación del Metabolismo de los Carbohidratos.

Me referiré a la compartimentación del metabolismo de los carbohidratos en tripanosomas y especies estrechamente emparentadas, con especial referencia a los glicosomas.

Estas especies carecen de reservas de polisacáridos, así como de fosfatos de alta energía, lo cual hace que dependan enteramente de fuentes exógenas de carbohidratos (Opperdoes y col. 1976). La glucosa es la fuente energética preferente, aunque la fructosa, manosa y glicerol también pueden sostener la motilidad y la respiración (Ryley, 1962).

Bajo condiciones anaeróbicas estos organismos convierten la glucosa cuantitativamente en cantidades equimolares de piruvato y glicerol (Fairlamb y col. 1977), los cuales

son excretados. Este proceso de dismutación de la glucosa sucede con síntesis neta de ATP (Böhringer y Hecker, 1975), lo cual solo puede ser explicado por la existencia de una compartimentación de la glucólisis de estas células.

El flujo glucolítico del carbono a través de las células de *Trypanosoma* es muy alto: en *T. brucei* se consume 0.08  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto y por miligramo de proteína, y una molécula de ATP se sintetiza por cada molécula de piruvato consumido (Fairlamb y Bowman, 1980; Opperdoes y col., 1976).

Después de la transformación de las formas tripomastigotas a la forma epimastigota dentro del insecto vector, el consumo de glucosa disminuye considerablemente, siendo el piruvato convertido a succinato, acetato y dióxido de carbono, que son los productos finales excretados. El metabolismo oxidativo de aminoácidos por el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria sirve, en esta fase del parásito, como la mejor fuente de energía.

Trabajos previos a 1977, aludían a una característica de los enzimas glucolíticos de *Trypanosoma* que estaban asociados a partículas (Reynolds, 1975; Ryley, 1962). Pero esta característica no fue comprendida hasta dicho año cuando Opperdoes y Borst (1977) describieron por primera vez la asociación de nueve enzimas con un orgánulo semejante a un microcuerpo en *T. brucei*. Siete de estos enzimas están implicados en la glucólisis [Hexoquinasa (HK), Fosfoglucoasa isomerasa (PGI), Fosfofructosa quinasa (PFK), Aldolasa (ALD), Triosa fosfato isomerasa (TIM), Gliceradehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), Fosfoglicerato quinasa (PGK)], mientras que los otros dos están relacionados con el metabolismo del glicerol [Glicerol Kinasa (GK), Glicerol Fosfato Deshidrogenasa (GPDH)]. Debido al alto grado de especialización de estos orgánulos y a la ausencia de enzimas marcadores típicos de otros orgánulos, se aceptó la denominación de glicosomas para ellos.

Los glicosomas han sido encontrados en otros miembros de la familia *Trypanosomatidae* (Cannata y col., 1982; Hart y Opperdoes, 1984; Taylor y col., 1979) como *Leishmania*, *Crithidia* y *Phytomonas*, aunque donde han sido mejor estudiados es en *Trypanosoma*, y en especial en *T. brucei*.

Análisis morfométricos (Opperdoes, 1984) han mostrado que estos orgánulos son homogéneos en tamaño, con un diámetro medio de 0.27  $\mu\text{m}$ . Tienen una matriz granular electrodensa y algunas veces contienen un núcleo cristalino. Está rodeado por una membrana normal de doble capa y de 6-7 nm de espesor. Como promedio las formas sanguíneas del tripanosoma contienen 240 glicosomas, los cuales representan entre el 4.3% (Opperdoes y col. 1984) y el 8% (Böhringer y Hecker, 1975) de su volumen total, siendo este porcentaje similar a su contenido en proteínas (Misset y col., 1986; Opperdoes y col., 1984).

En otros géneros los glicosomas, pueden ser menos abundantes. Las formas promastigotas de *Leishmania tropica* contienen solamente de 50 a 100 glicosomas, mientras que las formas amastigotas de *Leishmania mexicana*, no presentan más de 10 glicosomas (Coombs y col., 1986).

Estos orgánulos han sido purificados mediante diversas técnicas y analizada su composición química (Hart y col., 1984; Opperdoes y col., 1984). El 70% de las proteínas glicosomales han sido encontradas en la matriz, mientras que el 30% restante, parece estar asociado a la membrana (Opperdoes y col., 1984).

Un número muy limitado de polipéptidos están asociados con los glicosomas de las formas sanguíneas de *T. brucei*. La mayoría de ellos han sido identificados como subunidades de enzimas glucolíticas, representando más del 87% del total de proteínas glicosomales (Aman y col., 1985; Misset y col., 1986). En las formas procíclicas de *T. brucei*, la cantidad de polipéptidos glicosomales difiere significativamente de las formas sanguíneas, ya que se han detectado bandas adicionales de polipéptidos (Hart y col., 1984).

La membrana glicosomal posee la mayoría de los fosfolípidos presentes en el orgánulo, principalmente fosfatidil-colina y fosfatidil-etanolamina, no habiéndose detectado otros tipos de fosfolípidos en fracciones purificadas de las formas sanguíneas (Opperdoes y col., 1984). Sin embargo, en preparaciones similares de las formas procíclicas del insecto vector, estas contienen, además, fosfatidil-serina y fosfatidil-inositol (Hart y col., 1984).

Solamente se han detectado cantidades pequeñas de ADN en las fracciones glicosomales, aunque no hay evidencia de que exista un ADN específico del glicosoma (Opperdoes, y col., 1984), y las pequeñas cantidades detectadas pudieran ser ocasionadas por problemas de contaminación.

Los orgánulos tienen una densidad de  $1.09 \text{ g cm}^{-3}$ , y en gradiente de sacarosa estas bandas tienen una densidad de  $1.23 \text{ g cm}^{-3}$ , muy similar a la densidad de las bandas de otros microcuerpos de otras células eucarióticas (Opperdoes y col., 1984). Igual densidad se ha detectado para otras especies de esta familia.

Los glicosomas, a diferencia de otros microcuerpos, generalmente no contienen oxidasas productoras de peróxido de hidrógeno ni catalasas. Aunque, en el caso de *Crithidia*, se ha detectado una cierta actividad catalásica (Muse y Roberts, 1973). Igualmente, en glicosomas aislados en *T. cruzi*, se ha detectado una peroxidasa (DoCampo y col., 1986).

Además de las primeras enzimas de la secuencia glucolítica, se han encontrado también en los glicosomas fosfomanosa isomerasa (Hammond y col., 1985), las dos últimas enzimas de la biosíntesis de las pirimidinas (orotato fosforibosil transferasa y la orotidina carboxilasa), la hipoxantina guanina fosforibosil transferasa, y las enzimas adenilato kinasa (AK), malato deshidrogenasa (MDH) y la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK).

Igualmente, los glicosomas han sido involucrados en la síntesis de éteres-lipídicos, puesto que se han detectado los enzimas: DHAP, aciltransferasa, acil CoA reductasa y G-3P: NADP<sup>+</sup> óxido reductasa.

Cuando se utiliza un tampón isotónico de sacarosa para aislar los enzimas glucolíticos de los glicosomas, todos presentan enmascaramiento, que en algunos casos alcanzan valores de un 95%. Esto indujo a pensar (Opperdoes y Borst, 1977) que la membrana glicosomal actúa como una barrera semipermeable, que evita el paso de los intermediarios glucolíticos al citoplasma. Lo que ocurre realmente, es un proceso mucho más complejo. Después de romper la membrana glicosomal por técnicas apropiadas, se ha observado que algunos de los enzimas (especialmente la hexoquinasa [HK] y la fosfofructoquinasa [PFK], continúan presentando un considerable grado de latencia, el cual únicamente es eliminado por la adición posterior de detergentes y sales (Visser y Opperdoes, 1980); lo que hace pensar que están asociadas a las membranas del orgánulo.

Varios investigadores han comprobado que bajo determinadas condiciones, todos los enzimas, excepto la fosfoglucoisomerasa [PGI], se mantienen juntos y se comportan como miembros de un gran complejo multienzimático, incluso después de la eliminación total de la membrana (Oduro y col., 1980a; Oduro y col., 1980b; Opperdoes y Nwagwu, 1980). Tales complejos, por incremento de la fuerza iónica del medio, pueden ser disociados en sus componentes, y si se eliminan las sales por diálisis, los enzimas se vuelven a asociar (Visser y Opperdoes, 1980).

Estos datos sugieren que la latencia observada para algunos de los enzimas glucolíticos después de la ruptura del glicosoma, es debido a la limitada difusión de los sustratos y productos a través del complejo multienzimático de las proteínas glucolíticas.

Actualmente no se tiene un conocimiento completo de las propiedades de la permeabilidad de las membranas de los glicosomas.

Pueden aducirse varios argumentos que indican que la membrana glicosomal no es una barrera permeable. No existen evidencias de proteínas transportadoras específicas en esta membrana y los glicosomas aislados son capaces de catalizar parte de la vía glucolítica usando como sustratos intermediarios fosforilados, los cuales se supone, que no son capaces de atravesar la membrana glicosomal.

La actividad glucolítica es estimulada por cofactores del tipo NAD y ATP, los cuales tampoco pueden pasar libremente a través de la membrana. Hammon y col. (1985) han detectado cierta permeabilidad para los intermediarios pero también cierta compartimentación del ATP. y por último, Patthey y Deshusses (1986) han constatado que las membranas de glicosomas aislados son permeables a pequeños solutos pero no a grandes moléculas.

Experimentos con glucosa marcada, en células intactas, confirman la impermeabilidad de la membrana. Visser y col. (1981) demostraron que del 20 al 30% de los intermediarios glucolíticos están en compartimentos separados. Estos intermediarios fueron marcados completamente en 15 segundos comprobándose que aparecían niveles de piruvato marcado en el medio tras un tiempo similar. Este pool, que representa, probablemente, el compartimento glicosomal, solo se equilibró lentamente con el resto de la célula.

A la vista de estas últimas observaciones, lo más probable es que, en las células intactas, las membranas glicosomales formen una auténtica barrera a la permeabilidad para muchos de los intermediarios y cofactores glucolíticos.

Cualquier evidencia en contra o, cuando sea obtenida de orgánulos aislados, debe ser considerada con cierta precaución, debido a que no se puede descartar la aparición de ciertos artefactos como consecuencia de los procesos de purificación. Esta compartimentación proporciona a los tripanosomas ventajas importantes sobre otras células eucarióticas. En *T. brucei* las concentraciones intracelulares de los intermediarios glucolíticos no es distinta a la de otras células (Visser y col., 1981). Dado que los glicosomas representan solo el 4% del volumen celular y contienen del 20 al 30% de los intermediarios glucolíticos, la concentración de estos intermediarios en los glicosomas, debe ser al menos 5 veces más alta que en el citosol (Misset y Opperdoes, 1984; Misset y col., 1986).

Misset y col. (1984; 1986) han determinado la concentración de los sitios activos y metabolitos para las tres primeras etapas de la glucólisis en los glicosomas. Han observado que las concentraciones son muy similares y de rango milimolar. Dado que cada uno de estos enzimas tiene una  $K_m$ , del mismo orden de magnitud por sus respectivos sustratos, una alta proporción de los metabolitos glicosomales deben estar unidos a proteínas. Esto tiene implicaciones importantes para la comprensión de la glucólisis glicosomal.

Los datos cinéticos obtenidos de enzimas purificados, no pueden por tanto ser simplemente extrapolados a la situación dentro del glicosoma, ya que se refieren más bien a metabolitos libres que asociados.

Concentraciones altas de metabolitos intraglicosomales y sitios activos (Misset y col., 1986) permiten a los tripanosomas mantener un flujo glucolítico intenso con una cantidad de proteínas relativamente pequeña.

A este respecto, se ha sugerido que debe existir un paso de metabolitos a través del complejo multienzimático, aunque las evidencias que se poseen sólo se refieren a células intactas (Visser y col., 1981) y no a glicosomas aislados (Aman y Wang, 1986).

La alta eficacia glucolítica de los tripanosomas queda bien ilustrada por el hecho de que en tejidos musculares, que tienen una demanda muy alta por la glucosa, la GAPDH constituye más del 10% de la proteína soluble, mientras en tripanosomas este enzima representa sólo el 0.5% del total (Misset y col., 1986). No obstante, la tasa glucolítica de los tripanosomas es muy superior a la de otras células eucariotas.

Los datos que existen hasta la fecha no apoyan la existencia de un complejo multienzimático en el sentido de un grupo de enzimas bien ordenadas espacialmente. En primer lugar, los experimentos de "cross-linking", realizados por Aman y col. (1985), no permiten que tal complejo multienzimático exista "in situ". El hecho de que todos los enzimas se encuentren dentro de una fracción sedimentable puede ser explicado por la elevada concentración y la proximidad de los enzimas en los glicosomas (Aman y col., 1985; Misset y col., 1986). Segundo, no hay pruebas que confirmen el paso de metabolitos a través del complejo multienzimático como tal (Aman y col., 1985; 1986). Tercero, el cuerpo cristalino que se ha visto ocasionalmente dentro de los glicosomas tiene una estructura laminar con un espacio regular de 10 nm (Opperdoes y col., 1984). Esto está de acuerdo más bien con el diámetro de Stokes que se determinó para los dos enzimas mayores (HK y PFK, con 9 y 7.8 nm respectivamente) que con el del complejo multienzimático, para el que se ha estimado un diámetro de 27 nm (Misset y col., 1986). El hecho de que los dos últimos enzimas tiendan a formar agregados pesados, bajo condiciones de baja fuerza iónica (Misset y col., 1986) y la poca frecuencia con la que se observan los cuerpos cristalinos, apoya la idea de que estos pudieran tratarse de un artefacto.

Los glicosomas (en condiciones aeróbicas) catalizan las siguientes reacciones (Opperdoes y Borst, 1977):

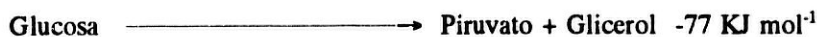


Dado que la producción y consumo de ATP y NAD están equilibrados, el glicosoma en sí mismo no está implicado en la síntesis neta del ATP. Esta ocurre en el citosol, donde el ácido fosfoglicérico es convertido a piruvato. El glicerol 3-fosfato producido por el glicosoma se reoxida a DHAP por una oxidasa terminal mitocondrial, este proceso no está relacionado con la fosforilación oxidativa (Grant y Sargent, 1960; Opperdoes y col., 1977).

Debido a que los experimentos de marcaje y los estudios de latencia de los enzimas glucolíticos, han demostrado que la membrana glicosomal es impermeable a todos los intermediarios fosforilados. Opperdoes y Borst (1977) proponen que existe un transportador específico para la Dihidroxiacetona fosfato (DHAP), el glicerol 3-fosfato (G-3P), el Acido fosfoglicérico (PGA) y el Pi que facilita su difusión a través de la membrana. Todavía no se han aportado evidencias directas que confirmen que la membrana tenga permeabilidad selectiva a estos compuestos pero que sea impermeable a otros intermediarios glucolíticos.

Otra ventaja importante de la compartimentación de la glucolisis es la posibilidad de la glucolisis anaerobia en ausencia de una lactato deshidrogenasa funcional. Bajo condiciones anaeróbicas, o cuando la glicerol 3-fosfato oxidasa es inhibida por el ácido salicil hidroxámico (SHAM), la glucosa es metabolizada a la misma velocidad que en condiciones aeróbicas, formando cantidades equimolares de piruvato y glicerol (Fairlamb y col., 1977; Opperdoes y col., 1976). En un principio se pensó que el glicerol era formado a partir de glicerol 3-fosfato por la acción de una fosfatasa (Bowman y Flynn, 1986), pero Borst (1977) y Opperdoes y col. (1976), han planteado que no se produciría producción neta de ATP bajo esas condiciones, consecuentemente el tripanosoma no sobreviviría anaeróbicamente, puesto que no tiene reserva de energía.

Experimentos "in vitro" han mostrado que los niveles de ATP fueron mantenidos en el trypanosoma aún cuando la respiración fue bloqueada por el ácido salicil hidroxámico (SHAM) (Opperdoes y col., 1976). Los cálculos termodinámicos nos muestran que el cambio de la energía libre standard de la transformación completa de glucosa a piruvato y glicerol es suficientemente negativo como para permitir la síntesis de una molécula de ATP:





Diversas hipótesis se han propuesto para intentar explicar esta reacción (Clarson y Brohn, 1976), de entre ellas la que parece más probable es la que apunta a que la síntesis neta de ATP se consigue como resultado de una reacción contraria a la catalizada por la glicerol quinasa, bajo condiciones anaeróbicas (Oppendoes y col., 1976). Esta reversión se facilita por el drástico incremento del glicerol 3-fosfato intracelular (Hammond y Bowman, 1980a,b; Visser y Oppendoes, 1980) y por la capacidad de cambiar la proporción ATP/ADP dentro del glicosoma independientemente del citoplasma. Estos dos hechos, junto con la relativamente alta actividad específica de la glicerol quinasa (Hammond y Bowman, 1980b; Oppendoes y col., 1976), permitirían la síntesis de glicerol y ATP a partir de glicerol 3-fosfato. Tal reacción podría ser facilitada por la presencia de mecanismos naturales de eliminación de ATP dentro del glicosoma (Hammond y col., 1985).

Existen diversas evidencias que apoyan esta hipótesis:

1º.- No se han encontrado nuevos intermediarios fosforilados o enzimas alternativas, que serían necesarias para otras hipótesis.

2º.- Solamente en estas especies se ha encontrado una elevada actividad específica glicerol en condiciones anaeróbicas (Hammond y Bowman, 1980a,b).

3º.- Se ha encontrado actividad glicerol 3-fosfato: ADP transfosforilasa catalizada por la glicerol quinasa (Hammond y col., 1985; Hammond y Bowman, 1980a,b).

4º.- Experimentos con glicerol marcado, [<sup>14</sup>C] glicerol, han demostrado que bajo condiciones anaeróbicas la glicerol quinasa funciona realmente en condiciones de equilibrio en vez de catalizar la fosforilación del glicerol a glicerol 3-fosfato (Hammond y Bowman, 1980a).

5º.- Finalmente Gruemberg y col.,(1980) han mostrado que en *T. brucei* el glicerol se elimina por medio de un proceso mediado por un transportador con una Km para el flujo del glicerol de menor orden de magnitud (20  $\mu$ M), que para su entrada. Esto podría ayudar a mantener baja la concentración intracelular de glicerol y por tanto evita la inhibición inversa de la glicerol quinasa por la acción de masa.

#### 1.A.4.C.- Regulación de la glucolisis.

La actividad individual de cada una de las enzimas glucolíticas excede al flujo glucolítico total. Al estudiar las velocidades relativas máximas (Misset y col., 1986; Oduro y col., 1980a,b) de los enzimas glucolíticos se ha encontrado que las reacciones catalizadas por la aldolasa

y la fosfogliceratomutasa pueden ser las etapas limitantes de la glucólisis. La hexoquinasa y la fosfofructoquinasa, dos enzimas que juegan un papel regulador muy importante en la mayoría de las células eucarióticas, no tienen tal misión en *T. brucei*. La hexoquinasa es insensible a la glucosa 6-fosfato y glucosa 1-6 bifosfato (Nwagwu y Opperdoes, 1981), mientras que la fosfofructoquinasa, aunque es un enzima alostérico, no se regula por compuestos como la fructosa 1-6 bisfosfato, fructosa 2-6 bisfosfato y el citrato (Cronin y Tipton, 1985; Nwagwu y Opperdoes, 1981; Taylor y col., 1979). Opperdoes y col. (1976) infieren que la glucólisis no es regulada a partir del hecho de que la transición desde las condiciones aeróbicas a anaeróbicas no cambia las tasas glucolíticas en las formas sanguíneas de *T. brucei*. Además un análisis de "cross-over" de los niveles intermediarios glucolíticos revelan que en tal transición no existen puntos de "cross-over" entre la glucosa 6-fosfato y el fosfoenol piruvato, por lo que deduce que las etapas limitantes deben de estar antes de la glucosa 6-fosfato. Esto se apoya en la sugerencia hecha por Gruemberg y col. (1978), en el sentido de que la etapa limitante pudiera ser la entrada de glucosa a través de la membrana.

Una serie de evidencias recientes, sugieren que la vía glucolítica puede ser regulada a nivel de la piruvato quinasa. La fructosa 2-6 bisfosfato, de la cual se sabe que es el más potente regulador de la fosfofructoquinasa en eucariotas, es totalmente inactivo sobre el enzima de las especies pertenecientes a la familia tripanosoma. Se ha visto en extractos de algunas especies de tripanosoma por ejemplo, que este compuesto es un potente activador de la actividad piruvato quinasa de estos parásitos (Van Schaftingen y col., 1985). Hasta la fecha este tipo de regulación parece ser exclusivo de la familia *Trypanosomatidae*, puesto que se ha encontrado en *T. brucei*, *Leishmania sp.*, *Crithidia* y *Phytomonas*, pero no se ha encontrado en Euglena, hongos o hígado de mamíferos (Van Schaftingen y col., 1985). En el caso del tripanosoma, la fructosa 2-6 bisfosfato solamente se ha detectado en las formas sanguíneas pero no se ha encontrado en las formas del insecto vector. Esto probablemente explica por qué en estos estadios, la piruvato quinasa es inactiva a pesar de que se ha podido detectar el enzima (Misset y Opperdoes, 1984; Opperdoes y Cottem, 1982). Todavía no se sabe si el papel regulador de este compuesto en el flujo de carbono desde el fosfoenol piruvato, es en el sentido de la forma de piruvato o volverlos hacia atrás y meterlos en los glicosomas hacia la formación de malato.

Se han purificado ya varios enzimas glucolíticos (Misset y col., 1986; Misset y Opperdoes, 1984) a pesar de las dificultades que implica, para la purificación individual, el hecho de que estos enzimas estén unidos. Misset y col., (1984; 1986), han purificado con éxito nueve enzimas glicosomales usando glicosomas tratados con detergente y por cromatografía con una elevada fuerza iónica. Cronin y Tipton (1985) han conseguido igualmente la purificación de la fosfofructoquinasa de *T. brucei*, aunque han utilizado métodos diferentes a los anteriores e igualmente se ha purificado la Malato deshidrogenasa y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa de *Leishmania* (Motttram y Coombs, 1985).

En esencia, los enzimas glucolíticos aislados de *T. brucei*, poseen las siguientes propiedades: la hexoquinasa tiene una subunidad de 50 Kd de tamaño, similar a los hongos, pero de la mitad de tamaño que la de los mamíferos (Misset y col., 1984; 1986). La hexoquinasa de tripanosoma es hexamérica. Esta es una propiedad única y característica de estos parásitos, ya que hasta la actualidad y para enzimas de mamíferos, insectos y plantas se ha descrito una hexoquinasa monomérica y en el caso de los hongos es dimérica. En el caso de la fosfofructoquinasa tripanosómica, aunque es tetramérica como todas las fosfofructoquinasas estudiadas hasta la fecha, tiene una subunidad de peso molecular de 50 Kd (Cronin y Tipton, 1985; Misset y col., 1986) que es bastante diferente a la de los enzimas de otros eucariotas (75-120 Kd) y bacterias (35 Kd). Con respecto a sus propiedades reguladoras, la fosfofructoquinasa se parece más bien a los enzimas bacterianos que a los de mamíferos, en el hecho de que no es activada ni por la fructosa 1-6 bisfosfato ni por la fructosa 2-6 bisfosfato, al igual que tampoco es inhibida por el citrato ni el fosfato.

Los otros siete enzimas son similares a sus isoenzimas en otros organismos, tanto en peso molecular como en la composición de las subunidades (Misset y col., 1986). No obstante, presentan un tamaño molecular que suele ser mayor (1-5 Kd).

Como se citó con anterioridad, en relación con la composición química de los glicosomas, los datos existentes no nos permiten afirmar la existencia de un ADN específico de los mismos (Oppendoes y col., 1984), por lo que es muy improbable que exista en él una maquinaria biosintética de proteínas; lo que si se sabe es que:

Los enzimas glucolíticos se han mantenido conservados a través de la evolución y esto ha permitido la identificación de los genes que codifican para algunos de estos enzimas, usando sondas heterólogas originarias de levaduras y mamíferos. Se han identificado los genes de la aldolasa, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (Michels y col., 1986), triosa isomerasa (Swinkels y col., 1986), fosfoglicerolquinasa (Osinga y col., 1985) y cada uno de ellos han sido localizados en un cromosoma nuclear (Gibson y col., 1985).

En el caso de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (Michels y col., 1986) y la aldolasa se han encontrado dos genes completamente idénticos, ligados y en tandem. En el caso de la triosa isomerasa solamente está presente un gen (Swinkels y col., 1986). Para la fosfogliceratoquinasa se han descrito tres genes en tandem y ligados pero no idénticos, dos de ellos codifican para la isoenzima fosfoglicerato quinasa citoplasmática y glicosomal, respectivamente (desconociéndose el papel que desempeña el tercer gen). La GPI sólo es codificada por un sólo gen.

La secuencia de eventos involucrados en la síntesis de los enzimas glucolíticos y su integración al glicosoma se han resuelto con experimentos de marcaje de pulso con [<sup>35</sup>S] Metionina

en tripomastigotes de *T. brucei* (Opperdoes y col., 1987). Los enzimas glicosómicos GAPDH, Aldolasa y GPDH aparecen primero en la fracción soluble del tripanosoma (citosol) y sólo unos minutos más tarde en la fracción rica de glicosomas. El tiempo de vida medio de estas proteínas en el citosol varió desde 1 hasta 3.4 minutos, lo que nos indica que su transferencia al glicosoma es un proceso muy eficiente.

Igualmente se sabe que la vida media de los polipéptidos glicosomales, una vez dentro del glicosoma es muy corta, se han encontrado valores de entre 30 minutos a 1 hora, dependiendo del método usado (Opperdoes y col., 1987). El hecho de que tres polipéptidos diferentes tengan una vida media muy similar nos puede indicar que el orgánulo en sí, tiene una alta tasa de recambio. Un tiempo de recambio de menos de 2 horas está en perfecta concordancia con la velocidad calculada de síntesis de los polipéptidos glicosomales, la cual es suficiente para el recambio del 1% del contenido enzimático total por minuto.

En los estudios realizados con el fin de ver en dónde se sintetizan estas enzimas, se ha visto que:

El ARNm para los enzimas glucolíticos se encontró predominantemente en polisomas libres, más que en polisomas asociados a membranas. Cada uno de estos productos, al ser sintetizados "in vitro" mostraron que el peso molecular aparente es igual al del enzima nativo aislado del glicosoma. Igualmente los polipéptidos en el citosol no cambiaron de tamaño cuando se transfirieron al glicosoma.

El tamaño de los polipéptidos nativos está en completa correspondencia con el predicho a partir de la secuencia nucleotídica de los genes respectivos. La secuenciación del extremo N-terminal de la proteína GAPDH (Michels y col., 1986) ha revelado que este extremo N-terminal no está sujeto a ninguna forma de procesamiento. No se han hallado evidencias de modificación covalente de las proteínas nativas en forma de glicosilación o fosforilación (Wierenga y col., 1987).

Todas estas observaciones juntas, indican que los polipéptidos glicosomales se sintetizan en el citoplasma y posttraduccionalmente son transferidos a los glicosomas por medio de un proceso que no implica ni corte de una secuencia líder ni una modificación secundaria.

La reciente purificación de nueve enzimas glicosomales (Misset y col., 1984; 1986) y dos de sus correspondientes citosólicos (GAPDH y PGK) (Misset y Opperdoes, 1989; Misset y col., 1987) ha revelado una cantidad de notables diferencias entre las enzimas glicosomales y sus homólogos solubles.

Las determinaciones de la masa molecular realizadas sobre gel de poliacrilamida con SDS, han demostrado que la GAPDH es 5 Kd más grande que su isoenzima citosólico y por lo menos 2 Kd más grande que cualquier otro GAPDH encontrado hasta ahora (Misset y col., 1987). Este mayor tamaño ha sido confirmado por datos de secuenciación (Michels y col., 1986). La GAPDH-glicosomal contiene varias inserciones únicas y una pequeña extensión C-terminal no encontrada en otras diez GAPDH cuyas secuencias son conocidas. Tiene un punto isoeléctrico de 9.3, mientras que el de las isoenzimas citosólicas es de 7.9 (Misset y col., 1987). Una de las inserciones únicas, localizada en la parte N-terminal de la GAPDH glicosomal, contiene tres residuos cargados positivamente y esta inserción está ausente de la parte N-terminal de su homólogo citosólico (Misset y col., 1987).

La ausencia de esta inserción positivamente cargada, explica probablemente las diferencias en el punto isoeléctrico entre estas dos isoenzimas.

La PGK glicosomal tiene una masa molecular de 47 Kd, mientras que la de su homólogo citosólico es de 45 Kd. Además, las dos isoenzimas difieren considerablemente en su punto isoeléctrico, con valores de 9.3 y 6.3 para las isoenzimas glicosomales y citosólicas respectivamente (Misset y Opperdoes, 1989). Sin embargo, parte de su moderada hidrofobicidad pudiera deberse a los 20 aminoácidos C-terminales de la isoenzima glicosomal. Los dos isoenzimas (glicosomal y citosólico) tienen el 93% de homologías en la secuencia (Osinga y col., 1985). El diferente peso molecular medido en electroforesis SDS-PAGE puede deberse a las extensiones C-terminales aunque las diferencias de carga se deban sólo a 12 de los 30 aminoácidos sustituyentes. El 7% de diferencia en que la secuencia puede ser responsable de la diferente topogénesis que muestran los isoenzimas (Wierenga y col., 1987; Borst, 1986; Osinga y col., 1985).

Algunos otros enzimas glicolíticos de *T. brucei* tienen también pesos moleculares significativamente más grandes que aquellos de sus homólogos en otros organismos (Misset y col., 1986). La PGI de *T. brucei* es 5 Kd más grande que la del músculo de conejo; la GPDH de *T. brucei* es dos veces más grande que la aislada del músculo de conejo (Clayton, 1985).

Cuando estas enzimas se someten a isoelectroenfoque todos excepto la PGI poseen un punto isoeléctrico entre 8.8 y 10.2. Estos valores son de 1 a 4 unidades más altos que en aquellos enzimas glicolíticos de los mamíferos y de 3 a 6 unidades más altos que la de los enzimas glicolíticos de otros organismos unicelulares (Misset y col., 1986).

La secuencia completa de aminoácidos de la aldolasa (Clayton, 1985) muestra que contiene una extensión C-terminal. Esto sugiere que tal extensión no es el común denominador responsable de la entrada al glicosoma; sin embargo, tiene una única inserción que lleva uno o más

residuos cargados positivamente y que no se encuentra en ningún otro homólogo cuya secuencia sea conocida (Wierenga y col., 1987).

Los datos acumulativos sobre la biosíntesis, secuenciación y propiedades de los enzimas glicosomales sugieren que tales enzimas, a diferencia de la mayoría de las proteínas mitocondriales, cloroplásticas y secretoras no necesitan una secuencia líder para su introducción en el orgánulo. Sin embargo, en su lugar, deben contener una señal topogénica interna. Tales señales pueden haber surgido de mutaciones individuales o pueden haberse integrado como bloques en una secuencia primaria y pueden por consiguiente, ser localizadas en las inserciones únicas para esos polipéptidos.

Wierenga y col. (1987), han modelado recientemente las secuencias de aminoácidos de tres enzimas glicosomales, TIM, PGK, y GAPDH en estructuras tridimensionales usando las coordenadas estructurales conocidas de sus enzimas homólogos de otros organismos. Han encontrado evidencias en el sentido de que todos estos enzimas tienen en común dos "hot spots" con una separación de 40 Å de los cuales uno siempre está asociado con el único punto de inserción. Estos "hot spots" incluyen un par de puntos de la cadena cargados positivamente y separados por 7 Å. La secuencia de la aldolasa glicosomal (Clayton, 1985), para la cual no se tiene información sobre la estructura tridimensional de su homólogo es similar en su conformación con las anteriores. Basado en estas semejanzas, Wierenga y col. (1987), han propuesto que esto tiene un importante papel en la entrada de los enzimas en los glicosomas.

Debido a que los glicosomas están altamente especializados en la glucólisis y a que contienen enzimas involucradas en la biosíntesis de las pirimidinas, llevó al Profesor De Duve (1982) a cuestionarse si los glicosomas y los peroxisomas están relacionados. Hay ahora evidencias fuertes que indican que los glicosomas comparten algunos enzimas y vías metabólicas importantes con los peroxisomas de eucariotas superiores. Por ejemplo: la catalasa se ha detectado en representantes de la familia *Trypanosomatidae* [*Crithidia* (Opperdoes y col., 1976, Muse y Roberts, 1973) y *Leptomonas samueli* (Souto-Padron y de Souza, 1982)]. Además varios enzimas relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos y la biosíntesis de ester-lípidos, considerados como marcadores de los peroxisomas en varios organismos han sido encontrados en glicosomas. Las proteínas glicosomales, como en los peroxisomas y glicosomas, parecen ser sintetizadas en ribosomas libres y luego transportados posttraduccionalmente dentro del orgánulo, sin la eliminación de una secuencia líder. Estas características junto con la semejanza morfológica de los dos tipos de orgánulos sugieren que los peroxisomas y los glicosomas están realmente relacionados.

A modo de resumen podemos decir que los tripanosomas poseen muchas características inusuales en el metabolismo de los carbohidratos con una gran compartimentación de estas vías.

Siete de los enzimas glucolíticos y dos relacionados con el metabolismo del glicerol están localizados dentro de los glicosomas.

Desde el descubrimiento de estos orgánulos en *T. brucei*, han sido también encontrados en un gran número de representantes de la familia *Trypanosomatidae*.

Los glicosomas también contienen adenilato quinasa, dos enzimas de la biosíntesis de las pirimidinas, una implicada en la degradación de las purinas y, dependiendo de la función metabólica de los orgánulos, Malato deshidrogenasa y Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

Las formas sanguíneas de muchos tripanosomas africanos dependen enteramente de la glucolisis para la producción de energía (Opperdoes, 1983a,b), la inhibición de esta vía por combinación de drogas (Fairlamb y col., 1977) produce una muerte rápida del tripanosoma y su completa eliminación del organismo infectado (Clarson y Brohn, 1976). Dos de las drogas más importantes en esta enfermedad, melarsoprol (Flynn y Bowman, 1974) y la suramina (Fairlamb y Bowman, 1980), matan a los organismos por inhibición de la glucolisis. Esto nos resalta que la vía glucolítica de los tripanosomas es un excelente objetivo en la investigación del desarrollo de nuevas drogas (Opperdoes, 1983a,b).

Los enzimas glucolíticos difieren de sus homólogos de otros organismos en que al menos algunos de ellos contienen inserciones únicas y cargas adicionales positivas en su superficie, separados por alrededor de 40 Amstrong, las cuales pueden funcionar como señales topogénicas para la entrada en el orgánulo.

Aparte de su función topogénica (característica específica común de los enzimas glicosomales) puede ser de interés para el diseño de drogas, no solo contra el agente de la enfermedad del sueño sino contra otros tripanosomátidos que tienen glicosomas. La suramina tiene una molécula asimétrica con dos grupos de carga negativa separada por una distancia de 40 Amstrong. Algunos de los enzimas glicosomales de *T. brucei* tienen una afinidad más alta por esta droga que sus homólogos de otros organismos (Fairlamb y Opperdoes, 1986; Misset y Opperdoes, 1984). Por tanto es posible que esta droga por su alta afinidad por los enzimas glicosomales, interfiera con la entrada de los polipéptidos al glicosoma y por tanto con la biogénesis del orgánulo completo (Opperdoes, 1987).

#### 1.A.4.D.- Metabolismo de los ácidos nucleicos.

Todas las formas de *T. cruzi* tienen capacidad para almacenar tanto purinas como pirimidinas aunque la capacidad de las formas intracelulares para acumular pirimidinas quizás sea menor que las de otras formas. Las formas en cultivo sin embargo son incapaces de sintetizar el anillo de la purina aunque existen ciertas pruebas de que las formas sanguíneas pueden obtener al menos parte de sus purinas de esta manera. Las distintas purinas y pirimidinas parecen ser libremente interconvertibles. Por otra parte los desoxirribonucleótidos se sintetizan a nivel de los ribonucleótidos difosfato aunque la evidencia que se posee de este mecanismo es indirecta. El desoxitimidilato se sintetiza en todas las formas del parásito bien mediante el ciclo de la timidilato sintasa (timidilato sintasa, dihidrofolato reductasa, una enzima activa que genera grupos de un carbono) o bien mediante acúmulos de timidina por medio de la reacción timidina-kinasa.

Asímismo todas las formas contienen ADN tanto en núcleos como en el kinetoplasto siendo probablemente la proporción de ADN extracelular en este último (20-30 %) más elevado que otras células eucarióticas.

En cuanto al ARN ribosomal se ha aislado de formas de cultivo y presenta valores de S sólo ligeramente distintos a los del ARN-r de mamífero. Las polimerasas de ácidos nucleicos aún no han sido estudiadas con detalle, aunque los resultados preliminares apuntan hacia la existencia de tres ARN-polimerasas en formas de cultivo semejantes a las encontradas en células de mamífero. También se ha puesto de manifiesto la existencia de enzimas implicadas en el catabolismo de ácidos nucleicos.

En resumen, nuevamente, los sistemas que intervienen en el metabolismo de los ácidos nucleicos en *T. cruzi*, son semejantes a los observados en células de mamífero a excepción de los siguientes aspectos particulares:

- 1.- La elevada proporción en todas las formas del parásito de ADN-k extracelular presentando una organización molecular característica que permite la unión preferencial de una serie de drogas antitripanosómicas (Delain y col., 1972).

- 2.- La presencia en todas las formas de una hidrofolato-reductasa diferente de la enzima isofuncional de mamíferos, ya que presenta un peso molecular aparente más elevado y es más sensible a la inhibición por 2,4-diamino-pirimidinas y otros compuestos heterocíclicos relacionados (Gutteridge., 1976).



3.- La presencia en todas las formas de una timidilato-sintasa que se distingue de la enzima equivalente de mamífero en su inhibición por magnesio, su mayor sensibilidad a la concentración de mercaptoetanol, sus elevados valores de Km aparente para el sustrato y el cofactor, su elevado peso molecular aparente y su pronunciada sensibilidad a la inhibición por suramina (Al-Chabali y Gutteridge; 1977).

4.- La presencia en todos los casos de una enzima que interviene en la ruta biosintética "de novo" de uridín monofosfato (UMP). Esta enzima está implicada en la formación de orotato y actúa mediante una hidroxilación más que por deshidrogenación como ocurre en mamíferos (Gutteridge, 1976).

Esta última diferencia quizás no sea explotable quimioterapéuticamente ya que una lesión metabólica a este nivel podría salvarse mediante un acúmulo de pirimidina (Gutteridge y Gaborak, 1977). La misma objeción no es aplicable en el caso de la timidilato sintasa ya que el almacenamiento de timidina "in vivo" es menos probable. En cuanto a la dihidropterato sintetasa, el blanco de las sulfonamidas, su presencia aún no ha sido establecida en tripanosomas, los cuales, al contrario de los parásitos esporozoarios, pueden utilizar folatos preformados.

#### 1.A.4.E.- Metabolismo proteico.

Los requisitos nutricionales en cuanto a aminoácidos se refiere de *T. cruzi*, aún no se ha establecido completamente, si bien la captación de aminoácidos y la síntesis de algunos de ellos a partir de glucosa ha sido estudiada por varios autores. La activación y utilización de aminoácidos para la síntesis proteica así como la estructura y el funcionamiento de los ribosomas donde este proceso presumiblemente tiene lugar, aún no se ha esclarecido completamente. La presencia de una capa superficial glucoproteica semejante a la establecida en formas sanguíneas de *T. brucei* no ha sido puesta de manifiesto, aunque hay pruebas que apoyan la existencia de algún tipo de capa superficial en tripomastigotes habiéndose aislado un lipopéptido fosfoglicano de la membrana de formas en cultivo.

Teniendo en cuenta la escasez de información en torno a este área del metabolismo, la formación de una idea clara sobre el metabolismo proteico de *T. cruzi* es difícil. Sin embargo parece demostrado que la captación de lisina es poco usual. Este aminoácido es transportado mediante la intervención de tres transportadores que operan a expensas de energía. Acumulan lisina frente a un gradiente de concentración y presentan perfiles de sensibilidad a inhibidores poco comunes.

#### 1.A.4.F.- Metabolismo lipídico.

Los análisis de lípidos llevados a cabo hasta el momento sólo se han realizado con formas en cultivo. Estos estudios indican una composición parecida a la de células de mamíferos aunque quizás pueda incluirse al ergosterol entre los esteroides presentes en el parásito. El posible papel de los ácidos grasos como fuente de energía, ha sido previamente mencionado aunque los detalles sobre las rutas implicadas son todavía desconocidos. La síntesis de fosfoglicéridos a partir de ácidos grasos ha sido puesta de manifiesto sobre todo en formas de cultivo. Por otra parte, existen también pruebas que indican una síntesis "de novo" de ácidos grasos así como una elongación de la cadena sobre todo en formas en cultivo.

Los esteroides presentes parecen obtenerse bien mediante acúmulo o síntesis.

En conjunto, los únicos puntos de interés en relación con el metabolismo lipídico son los siguientes:

- a) La presencia de ergosteroides.
- b) La utilización de treonina más que de glucosa, como ocurre en mamíferos, como fuente de unidades de acetato para la síntesis de ácidos grasos y la sensibilidad de ésta última a determinados inhibidores.

### 1.B.- *Leishmania donovani*.

*Leishmania donovani* es un protozoo perteneciente al Orden *Kinetoplástida*, familia *Trypanosomatidae*.

Fue Cunningham (1885) quien primero vió amastigotes de *Leishmania* en cortes microscópicos de lesiones cutáneas de pacientes indios y pensó que posiblemente se trataba de un miembro del orden *Mycetozoa*. Borovsky (1898) estudiando lesiones cutáneas similares en Turkenistán fue el primero en reconocer la naturaleza protozoaria del organismo, sin embargo no intentó identificarlo más ampliamente.

Leishman (1903) descubrió cuerpos intracelulares en las vísceras de casos fatales de Kala-azar en la India. Con mucha intuición reconoció que morfológicamente se parecían a los trypanosomas. En el mismo año Donovan (1903) hizo observaciones similares. Hacia 1900 se diagnosticaron los primeros casos de leishmaniosis visceral en China confirmada por Marchand y Ledingham en 1904. Laveran y Mesnil (1903) pensaron que el parásito asociado con el Kala-azar indio era un piroplasma y lo nombraron *Piroplasma donovani*, un nombre que fue corregido rápidamente por Ross en 1903 a *Leishmania donovani*.

#### 1.B.1.- Ciclo biológico.

El ciclo de vida de *Leishmania donovani* consta de dos etapas claramente diferenciadas: una en el hospedador intermediario y vector, y otra en el mamífero que actúa como reservorio.

El mosquito que actúa como vector en la transmisión de la leishmaniosis, ya sea cutánea o visceral, pertenece a los géneros *Phlebotomus* o *Lutzomya*, variando las especies según la localización geográfica y la especie de *Leishmania* transmitida. Así tenemos que para *L. donovani* el género siempre es *Phlebotomus*.

El *Phlebotomus* succiona sangre de un hospedador mamífero infectado y con ella ingiere macrófagos cargados con las formas amastigotas del parásito. A continuación ocurre la ruptura de estos macrófagos y la consiguiente liberación de los amastigotes en el principio del intestino del mosquito, donde se multiplican y transforman hasta formas promastigotas, las cuales se reproducen y colonizan el intestino medio y posterior; algunas se pegan a la pared intestinal embebiendo su flagelo en las microvellosidades de las células epiteliales intestinales o bien ensanchan su flagelo y se unen

a la cutícula de la pared intestinal del píloro o ileon por medio de hemidesmosomas (Killick-Kendrick y col. 1974; Molyneux y col. 1975). Los promastigotes se mueven hacia adelante hasta la mitad del tórax como haptomonadas con el flagelo ensanchado y pegados a la cutícula de la pared intestinal llegan hasta la válvula estomacal, faringe y cavidad bucal. Los promastigotes móviles que se encuentran en la boca del mosquito son liberados cuando este pica a un hospedador mamífero.

A continuación ocurre una adhesión y englobamiento por fagocitosis de los promastigotes por los macrófagos. Después hay una fusión del fagosoma que contiene al promastigote con el lisosoma del macrófago; y en el interior de este fagolisosoma ocurre la transformación del promastigote hasta amastigote. Posteriormente ocurre la multiplicación del amastigote y la formación de vacuolas parasitóforas que envuelven a cada amastigote. Finalmente la célula estalla liberando los parásitos que nuevamente son capturados por otros macrófagos. La duración precisa de la existencia de los promastigotes inoculados por el mosquito en el medio extracelular del lugar de la picadura es desconocida, pero puede depender de la proporción de macrófagos que migran al lugar de la misma.

Según Adler y Ber (1941) hay evidencias de que no todos los promastigotes pueden ser capaces de iniciar una infección tras la picadura del mosquito. Algunos pueden ser destruidos tras la captación por los macrófagos.

Killick-Kendrick y col. (1977) piensan que no todos los parásitos que hay en el mosquito son infectivos. Puede que una proporción de promastigotes en el inóculo no sea viable e incapaz por tanto de infectar al hospedador mamífero.

#### 1.B.1.A.- Morfología de *Leishmania donovani*.

Según lo referido anteriormente podemos deducir que *Leishmania donovani* es un protozoo flagelado que, dependiendo del tipo de hospedador y su localización puede presentar una u otra morfología.

Cada una de las formas adoptadas por este parásito tiene sus propias peculiaridades que en resumen son:

##### a) Amastigotes.

Es la forma como se encuentran en el interior de los macrófagos del hospedador mamífero, rodeados por la vacuola parasitófora. Son redondeados y libres de flagelo. El núcleo ocupa una posición central en la célula y el kinetoplasto se encuentra adyacente a él. El núcleo es redondeado

u oval y tiene un diámetro aproximado de 1 a 1.2 micras. El kinetoplasto también puede ser redondeado u oval y en tinciones aparece más teñido que el núcleo; sus dimensiones son de 0.5 a 0.8 micras de longitud y de 0.4 a 0.6 micras de diámetro.

El tamaño de las formas amastigotas de *Leishmania* varía según la especie de que se trate, en general va de 4 a 5 micras (Munis y Medina 1948; Gardener y col. 1977).

b) Promastigotes.

El promastigote es la forma típica de *Leishmania* hallada en el intestino medio del mosquito. Killick-Kendrick et al. (1974) apuntan que en algunas especies de *Leishmania* se distinguen dos formas de promastigotes:

-Promastigotes nectomónadas que se unen a la pared intestinal del mosquito insertando su largo flagelo entre las microvellosidades intestinales. Estas formas miden unas 12 micras de longitud. Tienen un kinetoplasto a poca distancia del extremo anterior de donde emerge el flagelo cuya longitud es aproximadamente la misma que el cuerpo, aunque puede llegar hasta 20 micras. El núcleo se encuentra en el centro del cuerpo del parásito. Estas formas al microscopio electrónico son muy electrodensas debido a su gran contenido en ribosomas.

-Promastigotes haptomónadas: menos electrodensos, mas cortos y mas gruesos que los nectomónadas. Estos promastigotes se unen a la cutícula que recubre la valva estomacal modificando su flagelo. Su longitud puede ser alrededor de 5 micras. El kinetoplasto está en el extremo anterior y el flagelo mide por encima de 15 micras.

c) Paramastigotes.

Killick-Kendrick en 1979 asegura haber encontrado una forma del parásito en el mosquito que no coincide morfológicamente con la configuración clásica de promastigote. El kinetoplasto no está situado anterior al núcleo, sin embargo el flagelo si emerge del extremo anterior. La bolsa flagelar se encuentra muy profunda y el kinetoplasto está al lado del núcleo.

### 1.B.1.B.- Ultraestructura de *Leishmania donovani*.

Al microscopio electrónico las principales estructuras que apreciamos son:

#### a) Membrana plasmática y órganos asociados.

La membrana plasmática de *Leishmania* es una unidad de membrana típica, trilaminar, con una anchura de 2-4 nm. Debajo se sitúa una película de microtúbulos con un diámetro externo de 20 a 22 nm y separados entre sí unos 35 a 42 nm. Estos túbulos están en un área cortical libre de ribosomas. La ausencia de ribosomas sugiere que el área que rodea a los microtúbulos es funcionalmente parte integral del órgano completo (Vickerman y Preston, 1976). Probablemente los microtúbulos sirvan como un citoesqueleto. Molyneux y col. (1975), observan que no existe conexión entre ellos y la membrana plasmática. Así como la dificultad de romper el ordenamiento de los microtúbulos.

Así mismo parecen demostrar que las formas nectomónadas de promastigotes poseen menos microtúbulos que las haptomónadas.

La estructura uniforme de la membrana plasmática y la película subyacente de microtúbulos se modifica en los promastigotes en el punto de salida del flagelo, desde el reservorio flagelar. La membrana del reservorio flagelar no está forrada con microtúbulos.

Se han observado desmosomas cuando la membrana plasmática del flagelo corre paralela a la del reservorio, entre el cuerpo del parásito y el flagelo, cuya función parece ser la de mantener la integridad del flagelo y el cuerpo del parásito como una unidad móvil.

Próxima a la membrana plasmática del reservorio de promastigotes, se sitúa una vacuola pulsátil. Aparece como una vacuola limitada por una membrana contigua con el retículo endoplasmático liso. Su función no es muy conocida en flagelados patógenos y no se sabe si no es otra que la osmoregulatoria.

#### c) Flagelo y Kinetosoma.

La estructura del axonema característica del flagelo en promastigotes de *Leishmania*, consta de nueve pares de dobletes periféricos que rodean a un par central. Esta disposición se observa distal al kinetosoma y el doblete central surge de la primera placa basal.

Alexander (1978) encuentra que en los amastigotes de *L. mexicana mexicana*, *L.*

*enriettii* y *L. major*, hay una disposición diferente del axonema desapareciendo la configuración 9+2, quedando únicamente los tripletes de la raíz flagelar. Esto es en parte debido a la reducción flagelar observada en amastigotes. En amastigotes de *L. mexicana mexicana*, los microtúbulos centrales están presentes sólo para una distancia limitada y uno o dos de los dobletes exteriores colapsan el centro del axonema. Este proceso precede la reducción del flagelo. Alexander sugiere que, en amastigotes, la ausencia de 2 túbulos centrales (singletes) se produce porque su papel en células móviles es determinar la dirección del flagelo y no tiene sentido en células no móviles.

Los promastigotes con un largo flagelo tienen una cuerda paraxial, de estructura paracrística, situada paralelamente al axonema. Está formado por dobletes (de 4 a 7) y su estructura es similar a la de los tripanosomas.

d) Kinetoplasto. Estructura mitocondrial.

El kinetoplasto, se sitúa posteriormente al kinetosoma, entre el núcleo y el flagelo, unido al aparato mitocondrial por sus bordes. Las crestas mitocondriales se pueden observar en la parte superior del kinetoplasto.

Es un disco arqueado que contiene gran cantidad de ADN, de un 20 a un 25 % del total del ADN celular. Compuesto en su mayor parte por moléculas minicirculares de ADN de 0.45  $\mu\text{m}$  de perímetro, con forma de "8" y dispuestos paralelamente dando sensación de doble hilera. Se calcula que hay  $2 \times 10^4$  minicírculos/kinetoplasto. También hay algunas moléculas maxicirculares de 10 micrómetros de perímetro, así como cadenas lineales de distinto tamaño (Leon y col. 1980).

La transformación amastigote-promastigote está asociada con un aumento en el número de perfiles mitocondriales por sección, presentándose un descenso significativo en el volumen mitocondrial relativo durante la transformación, aunque el tamaño absoluto del parásito aumentó. Alrededor de 5 horas después de que haya comenzado la transformación hasta promastigote, ocurre un gran ensanchamiento mitocondrial.

e) Núcleo.

La ultraestructura del núcleo para todas las formas de *Leishmania* es similar a la de otros organismos eucariotas.

El núcleo está rodeado por una doble membrana nuclear de 7 nm de grosor. Posee un nucleolo prominente situado centralmente, con un diámetro de 0.6 a 1  $\mu\text{m}$ . La cromatina se sitúa periféricamente. El nucleolo y la cromatina periférica son de una densidad similar al nucleoplasma

siendo menos electrodensos pero conteniendo pequeños acúmulos de gránulos. La membrana externa es continua con el retículo endoplasmático.

Al igual que ocurre con otros kinetoplastidos, las membranas nucleares quedan intactas durante la división. El núcleo dividiéndose presenta menos cromatina periférica que la célula no dividiéndose.

#### f) Estructuras citoplasmáticas.

Estudios ultraestructurales de *Leishmania* revelan la presencia dentro del citoplasma de orgánulos asociados a membrana tales como:

- Retículo endoplasmático.
- Aparato de Golgi.

El retículo endoplasmático tanto liso como rugoso se encuentra a lo largo del citoplasma, particularmente rodeando al núcleo.

El aparato de Golgi se encuentra próximo al reservorio y al kinetoplasto. Los productos de este aparato están empaquetados como lisosomas y juegan un papel en la digestión intracelular, pero la proximidad del aparato de Golgi al reservorio, y la observación de varias hidrolasas en el reservorio de otros trypanosomátidos indica que la digestión extracelular puede ocurrir en la bolsa flagelar (Preston, 1969).

Los lisosomas de *Leishmania* han sido poco estudiados y se han hecho deducciones por comparación con lo que se conoce sobre su papel en otros kinetoplastidos. Así se relacionan, primero, con el mecanismo de digestión de macromoléculas ingeridas y su presunta fusión con lisosomas primarios, derivados del aparato de Golgi. Y, segundo, con la exocitosis de cuerpos multivesiculados en la bolsa flagelar donde se detectan restos celulares y actividad citoquímica. Una tercera función de los lisosomas en Kinetoplastidos sugerida por Vickerman y Preston (1976), es la de controlar el reciclaje de las organelas por medio de la fusión de los lisosomas primarios, con orgánulos o estructuras del interior del parásito para formar autofagosomas.

Molineux y col. (1975) y Kanan (1975) encuentran en el citoplasma, tanto de amastigotes como de promastigotes, inclusiones de cuerpos lipídicos no rodeados de membrana y con un diámetro de 0.5  $\mu\text{m}$ .

Otras estructuras que se han encontrado en el citoplasma de *Leishmania*, son los peroxisomas que contienen enzimas oxidativas y juegan un papel importante en el metabolismo oxidativo de la célula.



### 1.B.1.C.- Bioquímica de *Leishmania donovani*.

Las investigaciones bioquímicas de las especies de *Leishmania* han sido limitadas. Los primeros trabajos datan de la década de los 40, con el trabajo de Chang (1948) y el de Fulton y Joyner (1949). Conocemos aspectos de la biosíntesis de macromoléculas, metabolismo energético y de nucleósidos con aspectos comunes y desiguales con otras células eucariotas.

#### 1.B.1.C.1.- Metabolismo energético.

Se han encontrado todas las enzimas glucolíticas y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en ambos estados de *Leishmania* (promastigotes y amastigotes). Su respiración es sensible a CN y utiliza estas rutas para la producción de energía.

Krassner y Flory (1972) demuestran la existencia de la gluconeogénesis medida por transaminasas, que convierten ciertos aminoácidos en intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Así, hay tres puntos principales de entrada en este ciclo:

1.- Por Acetil CoA a través del Piruvato, en el que se transforman aminoácidos como la alanina y la serina.

2.- Por alfa-cetoglutarato a través del glutamato, en el que se transforman aminoácidos como fenilalanina, isoleucina, valina, leucina, tirosina y ornitina.

3.- Por oxalacetato en el que se transforman la glicina y el ácido aspártico.

Esta actividad parece más que suficiente para el crecimiento de ciertas especies de *Leishmanias* en un medio libre de glucosa, usando los aminoácidos como fuente de energía.

Zilberstein y Dwyer (1984), encontraron sistemas de transporte eficientes para la glucosa y los aminoácidos en *L. donovani*.

Otro punto de interés es la existencia de enzimas para la Beta-oxidación de ácidos grasos y la utilización de los mismos como sustrato respiratorio, con una actividad mucho más alta en amastigotes que en promastigotes (Hart y col. 1981). Se piensa que *Leishmania* puede encontrar unas condiciones naturales pobre en hexosas en el intestino del mosquito y abundante en ácidos grasos en el compartimento lisosomal de los macrófagos.

#### 1.B.1.C.2.- Ácidos grasos y esteroides.

Se piensa en una posible implicación de los ácidos grasos en la inmunopatología de la leishmaniasis (Chang y Hendricks, 1985). La presencia de ergosterol en *Leishmania* es la base bioquímica para la actividad anti-*Leishmania* de la Anfotericina B y el Ketoconazol (Berman y col. 1984).

#### 1.B.1.C.3.- Nucleósidos de purinas y enzimas de nucleótidos.

Las especies de *Leishmania* no realizan la síntesis de novo de purinas (Trager 1974). Esto supone la inclusión de un mínimo de nucleobases o nucleosidos en el medio de cultivo, para el crecimiento de los promastigotes; sin embargo bajo estas condiciones es posible inducir la biosíntesis de novo por mecanismos "feedback" (Henderson y Paterson, 1973).

Marr y col. (1978) estudian el metabolismo de purinas en un medio libre de estas y demuestran que no hay síntesis de novo cuando se utilizan precursores marcados radiactivamente, tales como glicina, serina o formiato. Además, organismos puestos en un medio libre de purinas durante una semana no crecen, sin embargo el crecimiento se reemprende tan pronto como se añadía una purina. El mayor crecimiento se consigue con adenina e hipoxantina, tanto para *L. donovani* como para *L. braziliensis*.

En este trabajo, se usaron bases púricas y nucleósidos marcados con objeto de seguir las rutas metabólicas de las purinas en las dos especies anteriores. Encontrándose que la adenina y la inosina son convertidos hasta un intermediario común, la hypoxantina, siendo transformado a continuación hasta nucleótidos. La adenina se transforma hasta hypoxantina por la enzima adenina aminohidrolasa y los productos fueron metabolizados y excretados al medio.

Las enzimas en la ruta alternativa han sido los objetivos principales para la nueva quimioterapia de la leishmaniosis, usando análogos de nucleósidos tales como el Alopurinol y el Formycin B. El modo preciso de la acción anti-*Leishmania* de estos medicamentos, presenta controversias (Robinson y col. 1984). Hay evidencias que sugieren la inhibición de la síntesis de proteínas por el mRNA que contiene Formycin A en leishmanias tratadas con Formycin B (Nolan y col. 1984).

Dwyer y Gottlieb (1983), proponen que las enzimas defosforiladas encontradas en la membrana plasmática, pueden tener una función de reciclaje para la adquisición de nucleósidos necesarios para los parásitos.

Iovannisci y col. (1984), usando clones de mutantes de promastigotes de *L. donovani*, identifican dos sistemas de transporte de membrana distintos para nucleósidos.

#### 1.B.1.C.4.- Superóxido dismutasa e hidrolasas ácidas.

La superóxido dismutasa descrita en *Leishmania* y otros parásitos relacionados contiene hierro y es insensible a la cianida (Meshnick y Eaton 1981), tiene dos subunidades de 43 kDa cada una y su composición en aminoácidos es más similar al enzima bacteriana que a la de las células de mamíferos (Trang y col. 1983). Esta enzima, se piensa que protege a la *Leishmania* contra los metabolitos de oxígeno tóxicos producidos por los macrófagos, y se presupone ser un objetivo ideal para la quimioterapia.

Las hidrolasas ácidas han sido ensayadas en numerosas especies de *Leishmania*. Steiger y col. (1979), detectan alta actividad de proteasas ácidas y alfa-D-manosidasa, en promastigotes de *L. donovani*; otros enzimas lisosomales ensayados se encontraron que tenían muy baja actividad. Glew y col. (1982), confirmaron este dato y purificaron una fosfatasa ácida que tiene un peso molecular de alrededor de 170 kDa, un espectro de sustrato amplio y un pH óptimo de 5.

Coombs (1982), y Coombs y Baxter (1984) encontraron altas actividades de cistein-proteasas, especialmente en amastigotes de *L. mexicana* y actividad anti-*Leishmania*, de inhibidores como la antipaina y leupeptina cuando se añadía a macrófagos infectados.

En 1984 Pupkis y Coombs purificaron dos clases de proteasas de amastigotes, con pesos moleculares de 31 y 67 kDa; sólo la de mayor peso molecular fue encontrada en promastigotes.

#### 1.B.1.C.5.- Polisacáridos.

Decker-Jackson y Honigberg en 1978; y Greenblatt y col. en 1984, encontraron que los "factores excretados" o EF por *Leishmania* (Hernandez 1983), contenían moléculas de carbohidratos (peptidoglucanos) semejantes a los antígenos de los grupos sanguíneos humanos. Se ha propuesto una posible implicación de este antígeno semejante al del huésped en la inmunopatología de la leishmaniasis.

Turco y col. (1984), identifican en promastigotes de *L. donovani* una molécula de azúcar fosforilada de Man-PO<sub>4</sub>-Gal, que puede estar repetida formando un carbohidrato complejo.

Dagger y col. (1984), demuestran que la tunicamicina, un inhibidor de glycosiltransferasas para oligosacáridos unidos a N, es citotóxica para *L. braziliensis* e inhibía la incorporación de manosa.

Hay sin duda un aumento en el interés por los carbohidratos de *Leishmania*, en vista del posible papel que juegan como señales en el reconocimiento celular, en el papel de los mismos como antígenos protectores específicos y en las modificaciones que dichos peptidoglicanos juegan en la relación parásito-hospedador (Mcneely y col. 1990; Tolson y col. 1990; Turco y col. 1990).

#### 1.B.1.C.6.- Poliaminas.

Las poliaminas están presentes, con muy pocas excepciones, en todas las células vivas tales como la putrescina, espermidina y espermina. Estas pequeñas moléculas catiónicas se piensa que juegan papeles importantes en el crecimiento y diferenciación celular.

En promastigotes de *Leishmania*, Bachrach y col. (1979a) encontraron que los niveles de putrescina y espermidina son muy altos, mientras que la espermina es apenas detectable. El nivel de poliaminas y la razón putrescina-espermidina fluctúa con las fases de crecimiento de las *Leishmanias*, como se encontró en otros organismos.

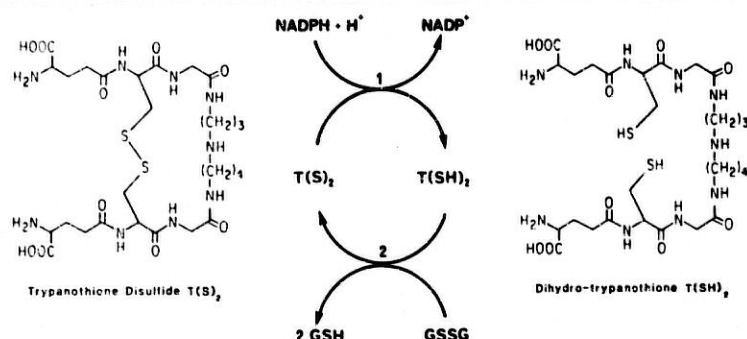
Durante la diferenciación de *L. donovani* desde amastigotes hasta promastigotes, se encontró que la espermina decrecía hasta un nivel despreciable, con el consiguiente aumento en los de putrescina y espermidina, y en sus enzimas biosintéticas, onitina y S-adenosilmetionina descarboxilasa (Morrow y col., 1980).

Algunos compuestos anti-tripanosomátidos afectan al nivel de poliaminas y a la biosíntesis de ácidos nucleicos de *Leishmania* (Bachrach y col. 1979b).

#### 1.B.1.D. Tripanotona y control del equilibrio redox de la célula.

La tripanotona fue descubierta como consecuencia de los estudios realizados sobre una inusual actividad glutatión reductasa en *T. brucei*, en donde se observó que un cofactor no identificado tenía un papel esencial en la reducción enzimática del glutatión disulfuro (GSSG) por el NADPH (Fairlamb y Cerami, 1985). Este cofactor se comprobó que estaba presente en extractos de todos los tripanosomatidos, aunque ausente en diversos mamíferos, bacterias y extractos de plantas. Experimentos preliminares mostraron que este cofactor tenía bajo peso molecular, estabilidad térmica,

y contenía un reducible grupo disulfuro (Fairlamb y Cerami, 1985). Posteriormente el compuesto fue purificado y se determinó su estructura, identificándose como el N<sup>1</sup>, N<sup>8</sup> - bis(glutationil) espermidina (Fairlamb y col., 1985). Como se encontró en tripanosomátidos, se le asignó el nombre trivial de tripanotiona. La estructura y terminología de los estados bioquímicos de esta molécula, son los mostrados en la siguiente figura. En ella se observa la reducción del Glutation Disulfuro (GSSG) en los tripanosomátidos. La reacción n<sup>o</sup> 1 es catalizada por la Tripanotiona Reductasa (TR), y la reacción n<sup>o</sup> 2 se desarrolla sin la intervención de enzimas.



En la célula, prácticamente toda la tripanotiona está presente como ditiol, dihidrotriptanotiona, debido a la acción del enzima tripanotiona reductasa NADPH dependiente (Shames y col., 1986). Este enzima es incapaz de reducir directamente el GSSH, en cambio, el GSSH u otros disulfuros intracelulares son reducidos indirectamente bajo un cambio no enzimático del tioldisulfuro, con dihidrotriptanotiona, el cual tiene un potencial standard redox ligeramente más electronegativo que el glutation [-0.242 V y -0.230 V, respectivamente] (Fairlamb y Henderson, 1987). El resultado de esta reacción es la reducción NADPH-dependiente del disulfuro, la cual se ha descubierto también en otros organismos.

El control del equilibrio redox intracelular es considerado esencial para algunas funciones celulares, incluyendo la síntesis y degradación de proteínas, la regulación de la actividad enzimática y la protección contra compuestos con oxígeno reactivo o radicales libres (Meister y Anderson, 1983; Meister, 1989). De este modo, compuestos que reduzcan los niveles de sustrato (triptanotiona), o que inhiban a la tripanotiona reductasa, pueden provocar daños a estos parásitos.

La Tripanotiona Reductasa (TR) juega, pues, un papel central en el mantenimiento del equilibrio redox intracelular y en la defensa frente al stress oxidativo. Este enzima está representando un objetivo para el desarrollo de nuevos compuestos trypanocidas. La TR ha sido purificada y caracterizada de *Crithidia fasciculata* (Shames y col., 1986) *T. cruzi* (Kranth-Siegel y col., 1987) y como proteína recombinante en el caso de *T. congolense* (Sullivan, 1989). Todos estos enzimas están relacionados estructuralmente con la glutation reductasa humana (Ghisia y Marsey, 1989), si bien

presentan diferencias en cuanto a sus especificidades por los sustratos. La TR puede no reducir significativamente al GSSG ni a la Tripanotiona disulfuro. La base molecular de la discriminación del sustrato por parte de los dos enzimas, es objeto de importantes investigaciones, ya que puede ser crucial para el diseño de un inhibidor selectivo.

La base molecular de la discriminación por el sustrato entre la GR y la TR, ha sido estudiada utilizando análogos a la tripanotiona, sintetizados químicamente (Henderson y col., 1987). Alguno de estos análogos, que siguen bajo estudio, pudiera mostrarse como un más potente inhibidor selectivo de la TR.

La ruta biosintética de la tripanotiona representa otro objetivo para el diseño racional de nuevas drogas (Fairlamb y col., 1986), y ha permitido abrir una nueva línea de síntesis de compuestos del tipo de la sulfoximina (Griffith y Meister, 1979) o de los derivados del alquilfosfinato (Duncan y Walsh, 1988) como inhibidores específicos de la Tripanotiona Sintasa.

Otro aspecto importante del metabolismo de la tripanotiona es que existe gran número de drogas capaces de interaccionar directa o indirectamente con la tripanotiona y sus funciones.

Esto puede tener una importancia clínica inmediata, en el hecho de que se puede aplicar una quimioterapia con una combinación de estas drogas; lo cual puede vencer algunas de las desventajas de los agentes quimioterápicos clásicos, como son la toxicidad y la resistencia que pueden presentar. Por ejemplo, se ha ensayado el sinergismo entre la difluorometilornitina (DFMO) y el melarsoprol, frente a la tripanosomiasis africana, comprobándose que de este modo se pueden reducir las dosis de administración del fármaco y la duración del tratamiento; pudiéndose también reducir la incidencia de los efectos secundarios, como es la encefalopatía inducida por compuestos arsenicales (Jennings, 1988).

La DFMO es también activa "in vitro" e "in vivo" frente a algunas especies de *Leishmania* [*L. donovani* (Kaur y col., 1986), *L.b. guyanensis* (Keithly y Fairlamb, 1989), y *L. infantum* (Balana-Fouce y col., 1989); aunque no frente a otras especies como *L. major* y *L. mexicana* (Keithly y Fairlamb, 1989)]. En *T. brucei*, la DFMO inhibe la biosíntesis de poliaminas y tripanotiona. Sin embargo, se han encontrado líneas DFMO-resistentes de *L. donovani*, que presentan una mayor expresión de la ornitíndecarboxilasa (ODC) (Coons y col., 1980).

La DFMO no tiene efectividad frente a *T. cruzi* (Kierszenbaum y col., 1987). Sin embargo, se ha comprobado que a concentración de orden milimolar, el compuesto difluorometilarginina (DFMA), interfiere en la capacidad de *T. cruzi* para infectar y multiplicarse en macrófagos "in vitro" (Kierszenbaum y col., 1987). La DFMA es un inhibidor de la Arginina

Decarboxilasa (ADC), sin embargo, los intentos por demostrar la actividad de la ADC en *T. cruzi* han sido infructuosos (Kierszenbaum y col., 1987), por lo que el modo de acción sigue siendo un misterio. Ciertos estudios realizados en *C. fasciculata* indican que la DFMA inhibe el crecimiento y la biosíntesis de poliaminas, al actuar en los pasos previos a la conversión enzimática del DFMO y la subsiguiente inhibición de la ODC (Hunter y col., 1990). No se conoce sin embargo que opere un mecanismo similar en *T. cruzi*.

La DFMO se ha ensayado también en el tratamiento de enfermedades crónicas provocadas por *T. gambiense* (Schechter y col., 1987) y *T. rhodesiense* (Bacchi, 1990). Sin embargo, no se han observado efectos dignos de mencionar.

Después de más de 80 años de investigación, los mecanismos de acción de los arsenicales trivalentes están poco claros. Recientes evidencias muestran que el primer objetivo de esta droga es la tripanotona, originando como resultado derivados ditioarsenicales (Fairlamb y col., 1987).

La toxicidad selectiva de los compuestos arsenicales, puede deberse al secuestro intracelular de la tripanotona. Alternativamente, el derivado ditioarsenical puede ser tóxico por inhibir la tripanotona reductasa ( $K_i = 9 \mu\text{M}$ ) o algún otro enzima tripanotona dependiente. Cualquiera que sea el mecanismo preciso de toxicidad, la disminución de la tripanotona inducida por la DFMO y el secuestro concomitante por arsenicales, ofrece una posible explicación para el sinergismo entre estos compuestos aparentemente no relacionados (Jennings, 1988; McCann y col., 1983).

Otro grupo de compuestos que presentan sinergismo con la DFMO, son las diamidinas pentamidina y Berenil (McCann y col., 1983). Estas drogas, pueden inhibir la actividad S-adenosilmetionina decarboxilasa en extractos celulares (Bitonti y col., 1986), bloqueando la síntesis de espermidina. El significado de este hecho no está claro, habiendo encontrado algunos autores un incremento en los niveles de espermidina en tripanosomas aislados de animales infectados, lo cual puede no concordar con la inhibición del enzima S-adenosilmetionina decarboxilasa. Se ha descrito también la inhibición no competitiva que provoca el Berenil en el transporte de la putrescina en *L. infantum* (Balana-Fouce y col., 1989). Esto no se ha puesto de manifiesto en tripanosomas africanos, lo cual puede significar que no posean un sistema de transporte semejante, si bien ello está en estudio.

En definitiva, el diseño de nuevas drogas específicas que actúen a nivel del metabolismo de los Trypanosomatidos, está en sus albores. Los avances futuros de esta línea de investigación, pueden proporcionar nuevos fármacos frente a la tripanosomiasis africana, la enfermedad de Chagas o las leishmaniasis.

### 1.C. Obtención "in vitro" de formas amastigotas.

Los intentos de obtener cultivos axénicos de amastigotes de diferentes especies de géneros de la familia Trypanosomatidae, han sido numerosos. La mayor parte de estos estudios se han centrado en especies del género *Leishmania* (Pan, 1984; Smejkal y col., 1984; Van der Ploeg y col., 1985; Darling y Blum, 1987; Stinson y col., 1989).

Según la mayor parte de los autores, la transformación "in vitro" ocurre cuando los parásitos se someten a un cambio brusco de temperatura, encontrándose en las formas obtenidas similitudes antigénicas y morfológicas entre los amastigotes intracelulares y las formas obtenidas "in vitro" (Pan, 1986; Smejkal y col., 1988; Eperon y McMahon-Pratt, 1989 a,b). Recientemente Doyle y col (1991), trabajando con *Leishmania donovani* han encontrado la posibilidad de mantener cultivos axénicos continuos de las formas aflageladas, cultivándolas a 37° C en un 100% de suero bovino fetal, consiguiendo la reversibilidad a formas aflageladas cuando disminuyen la temperatura a 28° C. No obstante la transferencia a un medio semidefinido induce la muerte del protozoo.

En la presente tesis, se han logrado obtener "in vitro", en medio semidefinido, formas aflageladas tanto de *T. cruzi* como de *L. donovani*; comprobándose las semejanzas ultraestructurales, bioquímicas e inmunológicas existentes con las formas amastigotes aisladas de células.

### 1.D.- Epidemiología.

#### 1.D.1.- Epidemiología de la enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas se encuentra extendida por las zonas rurales desde el sur de Estados Unidos hasta el sector septentrional de Argentina. Donde quiera que las condiciones ecológicas permitan que los vectores entren en contacto con la población humana se produce, normalmente, una evolución hacia las fases aguda y crónica. La primera es más frecuente en los niños y dura de 1 a 3 meses. La fase crónica se manifiesta a los 10 o 15 años después de la infección y se caracteriza por el desarrollo lento de una afección cardíaca. Entre estas dos fases transcurre un periodo asintomático o latente, cuya presencia sólo se detecta por la infección parasitaria transitoria y la reactividad serológica de la persona afectada.

Todavía se desconocen en muchos países la importancia de la enfermedad como problema de salud pública, ya que la notificación no es obligatoria ni se dispone de datos de



morbilidad fidedigna. La enfermedad ha sido estudiada con más detenimiento en Argentina, Brasil, Chile, Uruguay y Venezuela, donde se están llevando a cabo actividades de control del vector. Las evaluaciones entomológicas y serológicas realizadas en estos países, ofrecen indicios de la interrupción de la transmisión en las zonas tratadas con insecticidas. En los países latinoamericanos, las actividades todavía consisten en estudios de la distribución y frecuencia de la enfermedad.

Sin embargo, es también posible la transmisión directa de *Trypanosoma cruzi*, "vertebrado-vertebrado", mediante el coito, secreción láctea de las hembras parasitadas, transfusiones sanguíneas e incluso por vía transplacentaria. Existiendo numerosos casos descritos de niños prematuros infectados por *T. cruzi*, nacidos de madres asintomáticas. Se observa que la infección "in útero" ocurre con una frecuencia superior a la de la toxoplasmosis y similar a la de la sífilis.

La incidencia de la infección de *T. cruzi* en bancos de sangre en latinoamérica, oscila entre el 1'3 % y el 28 % (Ruiz-Pérez, 1985).

En la epidemiología de esta parasitosis debemos de tener en cuenta los siguientes factores:

La existencia de mamíferos, tanto domésticos como peridomésticos y salvajes que actúan como reservorios, encontrándose entre ellos: perros, gatos, armadillos, murciélagos, zorros, ratas, ardillas, monos, etc., lo que dificulta la erradicación de esta parasitosis.

La edad del sujeto susceptible es un factor importante, ya que la infección la adquieren más frecuentemente los niños comprendidos entre unos meses y dos años.

Las condiciones socioeconómicas juegan un papel decisivo, ya que los vectores encuentran un habitat favorable en las viviendas suburbanas y rurales de las zonas endémicas, haciendo entre las grietas y orificios de dichas viviendas sus madrigueras que sólo abandonan nocturnamente para alimentarse (Gamarro, 1983).

#### **1.D.2.- Epidemiología de la Leishmaniasis visceral.**

Excepto en la India, la leishmaniasis visceral es una zoonosis. En los focos africanos, los elementos conocidos de esta enfermedad son *L. donovani*, *Phlebotomus orientalis*, roedores y carnívoros. Los flebotomos y mamíferos reservorios son los huéspedes naturales que aseguran la supervivencia del parásito. El hombre es un huésped "accidental" que probablemente influye poco en

el mantenimiento del ciclo biológico. En China, la cuenca del mediterráneo y en Brasil, los cánidos intervienen en la persistencia de los focos, con subespecies de *L. donovani* como agente infectivo. Los vectores en estos focos son *Phlebotomus chinensis* (Asia), *P. ariasi*, *P. perniciosus* y otras especies (cuenca mediterránea) y *Lutzomyia longipappis* (Brasil). Sin embargo, en el nordeste de la India, el kala-azar es una antroponosis, no habiendo indicios de huéspedes reservorios mamíferos aparte del hombre mismo. Aquí, el parásito es también *L. donovani*, pero el vector es *P. argentipes*. Las estrategias de lucha, son dependientes de la zona geográfica, si bien la detección pasiva y el tratamiento de los casos disminuiría la morbilidad y la mortalidad; y si a ello unimos la detección activa de los casos, se podrían reducir también las tasas de transmisión. En lo relativo a la lucha contra los vectores, durante las epidemias se desarrollan actividades de rociamiento con insecticidas en gran escala, tanto en las zonas afectadas como en las circundantes. En las situaciones endémicas, los rociamientos pueden limitarse a las zonas infectadas, efectuándose inmediatamente antes de que la población de vectores alcance la máxima densidad. La implantación de estos métodos de lucha, aún no está generalizada, y los efectos de su utilización en muchos casos no se han evaluado plenamente (Killick-Kendrick, 1979).

### **1.E.- Aspectos anatomoclínicos.**

#### **1.E.1.- Aspectos anatomoclínicos de la Enfermedad de Chagas.**

##### **1.E.1.A.- Distribución del tripanosoma en los tejidos del huésped.**

La penetración de *T. cruzi* a través de la piel y las membranas mucosas va seguida de una inflamación aguda que se manifiesta clínicamente por un chagoma o signo de Romana. A continuación, los parásitos llegan al torrente circulatorio localizándose en diferentes tejidos viscerales. En los casos agudos, las formas amastigotas se multiplican por fisión binaria ocupando el citoplasma de las células del huésped. Los tejidos más comunmente parasitados tanto en el hombre, como en los animales son el corazón, el músculo esquelético, el músculo liso y la neuroglia, pero también se han observado parásitos en sitios poco comunes como las células epiteliales de la piel, los tejidos subcutáneo y adiposo, la submucosa gástrica, los testículos, el epitelio de transición y las vellosidades corianales. Se ha demostrado que la duración del ciclo endógeno es de tres a seis días en la enfermedad aguda, aunque no se conoce bien su naturaleza en la enfermedad crónica. Los estudios realizados sobre la distribución o localización de los parásitos durante la fase crónica en animales de experimentación no han sido satisfactorios porque se han observado variaciones extremas con la misma

cepa en experimentos consecutivos.

Muy rara vez se encuentran tripanosomas libres en la enfermedad de Chagas crónica, aunque se han hallado pseudoquistes de amastigotes en el corazón (órgano examinado con más intensidad que cualquier otro), en el esófago, intestino grueso, gánglios linfáticos y músculo esquelético. No existe correlación entre la extensión y gravedad de las lesiones inflamatorias y la localización y cantidad de pseudoquistes aunque en ocasiones se observan lesiones inflamatorias granulomatosas en asociación con pseudoquistes rotos.

Es unánime la opinión de que el principal órgano afectado en la enfermedad de Chagas aguda es el corazón. Generalmente se hallan parásitos en la circulación periférica. En menor proporción están parasitados otros órganos y sistemas que, en orden descendente de frecuencia, comprenden el sistema nervioso central, el aparato digestivo y el aparato respiratorio. No se conocen las razones de esa predilección por el miocardio. En la enfermedad de Chagas crónica se presenta la misma distribución, pero la densidad parasitaria es muy inferior y a menudo resulta imposible encontrar parásitos.

En el centro de Brasil, las manifestaciones clínicas y anatomopatológicas de la enfermedad de Chagas crónica afectan al corazón, el aparato digestivo y al aparato respiratorio. En la parte meridional de Sudamérica se encuentran con bastante frecuencia casos de megacolon y, con menos frecuencia, de megaesófago. Al parecer, esas anomalías no se presentan en proporciones tan altas en la parte septentrional de Sudamérica ni en Centroamérica. Experimentalmente se ha demostrado el predominio de lesiones del sistema reticuloendotelial en las infecciones producidas por una cepa colombiana y el de lesiones del aparato digestivo en infecciones por una cepa brasileña.

Aunque está comprobada la existencia de la enfermedad de Chagas congénita, no se ha estudiado ampliamente la frecuencia ni la importancia de la transmisión transplacentaria. Sin embargo, algunos casos notificados que han sido objeto de un estudio detenido indican que esa transmisión puede ser importante.

En la fase aguda de la enfermedad de Chagas, la manifestación de los síntomas clínicos puede ir precedida de la aparición de una lesión, llamada chagoma, en el punto de entrada del parásito. El chagoma típico es una zona de necrosis de la piel y tejido subcutáneo. El signo de Romana, otro tipo de lesión en el punto de entrada, consiste en un edema generalmente palpebral unilateral, acompañado de conjuntivitis y de linfadenopatía, como resultado de la contaminación del saco conjuntival por material fecal infectado procedente del vector. Los dos tipos de lesión tienen valor diagnóstico pero ninguno de ellos desempeña una parte importante en la evolución subsiguiente de la enfermedad. Las lesiones a veces persisten hasta dos meses, periodo durante el cual pueden

identificarse los parásitos en las células de la piel y en los tejidos adyacentes.

No se conoce bien la frecuencia con que aparece el chagoma "típico". El signo de Romaña se observa a menudo, tal vez porque el saco conjuntival es la puerta de entrada más común del parásito, o quizá porque una infección ocular es una razón más imperiosa para consultar al médico.

#### **1.E.1.B.- Lesiones cardíacas.**

La cardiomiopatía es la manifestación más importante y frecuente de la enfermedad de Chagas, tanto aguda como crónica, y da origen a arritmias, insuficiencia cardíaca y fenómenos tromboembólicos. La cardiomiopatía de la forma aguda de la enfermedad de Chagas se caracteriza por una inflamación intersticial intensa y ampliamente difundida, y por la presencia de formas amastigotes del parásito dentro de las fibras miocárdicas. Los infiltrados celulares pueden estar compuestos por neutrófilos polimorfonucleares, monocitos y linfocitos, asociados a un edema considerable. El proceso inflamatorio puede extenderse al endocardio y pericardio, y el miocardio adyacente a los infiltrados puede sufrir lesiones degenerativas.

Las fibras parasitadas del miocardio no dan lugar a inflamación hasta después de la ruptura. Se ha demostrado que las lesiones cardíacas de la enfermedad en su forma aguda, en animales, algunas veces llegan a cicatrizar casi por completo. No se conocen bien las alteraciones patológicas que se producen en el corazón durante el periodo latente que precede a la enfermedad de Chagas crónica en el hombre.

Las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas aguda son la cardiomegalia, con insuficiencia cardíaca o sin ella, y modificaciones variables y transitorias del electrocardiograma, a saber, alteraciones de la repolarización y, menos frecuentemente, defectos de conducción. La mayoría de los casos evolucionan a la curación.

En la enfermedad crónica las principales manifestaciones clínicas son la cardiomegalia y la insuficiencia, arritmias y defectos de conducción, y fenómenos tromboembólicos. Cualquiera de ellas puede ser causa de muerte repentina.

Clínicamente se ha observado que a veces puede registrarse la muerte repentina por cardiomiopatía de Chagas sin que pueda demostrarse parasitación del miocardio y sin manifestaciones clínicas previas de la enfermedad aguda o crónica. Los signos macroscópicos característicos son la hipertrofia del miocardio; dilatación y adelgazamiento de la punta de los ventrículos con formación de aneurismas apicales y con trombosis o sin ella, y protrusión del cono pulmonar.

En la cardiomiopatía de Chagas crónica las lesiones histopatológicas comprenden la miocarditis focal, fibrosis y miocitolisis extensa, que suelen producirse sin parasitación demostrable de las fibras miocárdicas. La reacción inflamatoria intersticial puede ser densa y polimorfa, con presencia de monocitos, histiocitos, linfocitos y unos cuantos plasmocitos y eosinófilos. La reacción fibroblástica, que varía con extensión de intensidad, por lo general se localiza en los dos tercios interiores de los ventrículos; es frecuente que se presente cerca de la punta del corazón, donde puede acompañarse de aneurisma.

El aneurisma apical, que se considera característico de la enfermedad, se observa con frecuencia en dispensarios y laboratorios de anatomía patológica regionales. Aunque se han propuesto muchas hipótesis, no se conoce la patogenia de esa lesión.

Tanto en las formas agudas como en las crónicas hay lesiones en los gánglios del corazón, con inflamación o sin ella, y con reducción del número de células ganglionares.

A pesar que se ha estudiado extensamente la patogenia de la enfermedad de Chagas, dista mucho de conocerse por completo. Es difícil identificar los mecanismos que provocan los diferentes efectos locales del parásito. Se ha supuesto que, además del factor mecánico relacionado con la multiplicación intracelular del parásito, hay factores tóxicos y enzimáticos que provocan la ruptura de la fibra miocárdica, con la reacción inflamatoria consiguiente. Sin embargo, no se han identificado toxinas específicas.

#### **1.E.1.C.- Lesiones neurológicas.**

En la enfermedad de Chagas, tanto aguda como crónica, se observan lesiones de las células ganglionares del sistema nervioso autónomo, cuya causa se desconoce, aunque se ha supuesto que son el resultado de la acción de los productos de degeneración de los parásitos.

En diferentes zonas de Sudamérica se han observado variaciones del grado de invasión de los gánglios con participación de esas lesiones en la patogenia de la fase crónica de la enfermedad, necesitándose comparaciones cuantitativas. También deben emprenderse estudios para aclarar las perturbaciones de orden nervioso, en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

En la forma aguda pueden presentarse en el sistema nervioso central lesiones graves de carácter inflamatorio y degenerativo, que llegan a producir la muerte. Carlos Chagas, entre 1909 y 1912, encontró frecuentemente casos agudos mortales con lesiones neurológicas, pero hoy en día esos casos parecen ser muy raros, lo que puede ser una razón que explique la disminución de la mortalidad.

### **1.E.1.D.- Importancia de las reacciones antígeno-anticuerpo en la patogenia.**

Se ha supuesto que las reacciones antígeno-anticuerpo son responsables de algunas de las alteraciones anatomopatológicas que se registran en la cardiomiopatía de Chagas crónica, hipótesis que se funda en los datos siguientes:

a) Se ha observado artritis de tipo alérgico, aunque es extremadamente rara tanto en los seres humanos como en los animales de experimentación.

b) Algunos datos experimentales indican que interviene un mecanismo alérgico en la producción de la miocardiopatía de Chagas. Por otra parte, se considera que los experimentos de este tipo no reproducen sino algunas de las características de la enfermedad pero no su forma crónica.

Se ha pensado también en que se trate de una reacción de autoinmunidad. Lo mismo en las formas agudas de la enfermedad que en las crónicas se han puesto de manifiesto autoanticuerpos en los enfermos afectados por el mal de Chagas (Ruiz-Pérez, 1985).

### **1.E.2.- Aspectos anatomoclínicos de las leishmaniasis humanas.**

#### **1.E.2.A.- Formas clínicas de las leishmaniasis humanas.**

##### **1.E.2.A.1.- La leishmaniasis visceral del Viejo Mundo.**

La leishmaniasis visceral es causada por parásitos del complejo *L. donovani*. Puede ser endémica, esporádica o epidémica, con rasgos clínicos diferentes en cada una de esas situaciones.

En las zonas en que es endémica la enfermedad, tiende a ser crónica y afecta especialmente a niños. En la leishmaniasis visceral endémica de Africa del norte y Asia sudoccidental, el grupo de edad más afectado es el de los niños de 1 a 4 años. En Europa meridional y en China son afectados todos los grupos de edad. En Africa oriental y en la India, la edad en que más se contrae va de los 5 a los 9 años, aunque la enfermedad se observa también entre los adolescentes. El número de varones afectados es el doble que el de mujeres. El periodo de incubación oscila entre 10 días y más de un año, y la enfermedad se manifiesta gradualmente. Los síntomas más frecuentes son fiebre, malestar, escalofríos o tiritona, pérdida de peso, anorexia y molestias en el hipocondrio izquierdo. La

tos y la diarrea son menos frecuentes. Los signos clínicos habituales son esplenomegalia indolora a la presión, con o sin hepatomegalia, consunción y palidez de las membranas mucosas; puede haber también linfadenopatía. En Bengala occidental, ésta puede ser la única manifestación clínica. En la India es frecuente el oscurecimiento de la piel de cara, manos, pies y abdomen (kala-azar significa enfermedad negra). Con frecuencia en el Sudán y rara vez en Africa oriental, puede haber una úlcera o nódulo cutáneo o una lesión de las mucosas, que contiene parásitos leishmánicos. Van apareciendo signos de malnutrición (edema y alteraciones de la piel y el cabello). Afecciones intercurrentes como neumonía, disentería o tuberculosis pulmonar pueden complicar la enfermedad.

La leishmaniasis visceral esporádica puede presentarse en personas no nativas, de cualquier edad, que visitan una zona endémica. Esos casos son por lo general agudos, con aparición brusca de fiebre, de tres semanas a dos años después de la exposición. La enfermedad puede avanzar en forma aguda con escalofríos, fiebre alta ondulante, a menudo con dos máximos al día, sudor copioso, rápida pérdida de peso y malestar profundo. En estos pacientes es más probable la aparición de complicaciones raras, como anemia hemolítica aguda grave, lesión renal aguda y hemorragia intensa de las mucosas.

En la leishmaniasis epidémica, son susceptibles las personas de todas las edades, excepto las que hayan adquirido inmunidad durante una epidemia anterior. La infección es más frecuente en los hombres que en las mujeres.

Se cree que en algunos países (Brasil, Italia y Kenya) los casos subclínicos superan a los clínicos en una proporción aproximada de 5:1. En las personas con inmunosupresión debida al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o a quimioterapia, se están presentando cada vez más casos de leishmaniasis visceral, que son especialmente difíciles de tratar. Alvar et al. (1987) presentan la historia clínica de una mujer de 38 años adicta a la heroína, a la que se le diagnostica leishmaniasis visceral y hepatitis crónica. Tras repetidos tratamientos que resultaron ineficaces se le desarrolló un cuadro de insuficiencia renal y posteriormente edema agudo de pulmón y muerte. Estudios serológicos retrospectivos para el virus HIV dieron positivos.

Otro caso, de los muchos que se han dado, en un enfermo de SIDA fué diagnosticado por la detección de *Leishmania* en médula ósea y un título de anticuerpos antileishmania de 1:2048. El tratamiento hubo de interrumpirse por la aparición de disnea, cardiomegalia y derrame pericárdico que cesó 3 días después de cesar la medicación. Después del tratamiento la esplenomegalia disminuyó y no se detectaron parásitos, si bien los títulos de anticuerpos aumentaron a 1:16000 (Rizzi et al. 1988).

La leishmaniasis dérmica postkala-azar, causada por *L. donovani*, puede aparecer en

cualquier zona endémica pero es frecuente sobre todo en el subcontinente indio. Se manifiesta entre seis meses y uno o varios años después de que se haya curado en apariencia la leishmaniasis visceral, aunque en escasas ocasiones puede presentarse conjuntamente con ésta. Es posible que no haya antecedentes de leishmaniasis. Las máculas hipopigmentadas o eritematosas en cualquier parte del cuerpo o el enrojecimiento de la cara pueden hacerse más adelante, nodulares o papulares, especialmente en la cara. Las lesiones crónicas son infiltraciones papulares o nodulares múltiples de la piel, habitualmente sin ulceración (que a menudo se confunden con las lesiones de la lepra); sin embargo, la leishmaniasis dérmica postkala-azar puede afectar a la lengua o a los labios y causar úlceras. El mismo paciente puede presentar todas las formas: macular, papular y nodular.

#### 1.E.2.A.2.- Leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo.

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis cutánea suelen diferir según las regiones e incluso en una misma región, dependiendo de las diferentes especies de parásitos o del tipo de ciclo zoonótico y también quizá de la respuesta del paciente determinada por factores genéticos. La lesión "clásica" comienza en forma de nódulo en el lugar de la inoculación. En el centro se forma una costra que puede desprenderse, exponiendo una úlcera que se cura gradualmente y deja una cicatriz ligeramente hundida con pigmento alterado. Son corrientes los nódulos secundarios en el borde de la lesión. Existen formas muy lentas o que no curan, así como infecciones subclínicas. El clínico debe tener en cuenta que la leishmaniasis cutánea puede presentar formas muy diversas.

La leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo es causada normalmente por tres especies de *Leishmania*: *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*. En la cuenca del Mediterráneo occidental y en la Confederación de Estados Independientes se han notificado lesiones cutáneas debidas a *L. infantum*, sin manifestaciones de leishmaniasis visceral.

La leishmaniasis cutánea antroponótica o urbana causada por *L. tropica*, produce ulceración indolora de la piel, que a menudo deja cicatrices desfigurantes. Las úlceras secas suelen tardar un año o a veces más tiempo en curar espontáneamente. El periodo de incubación es por lo común de dos a ocho meses.

La leishmaniasis recidivante, en sus formas lupoide o tuberculoide crónica, puede durar muchos años y responde poco al tratamiento. La lesión, de progresión lenta, habitualmente en la cara, se caracteriza por una cicatriz con actividad periférica. Esta enfermedad, si no se trata, es destructiva y desfigurante. La escasez de amastigotes en la lesión facilita su diagnóstico equivocado como lupus vulgaris.



La leishmaniasis cutánea zoonótica o rural, causada por *L. major*, es indolora, como otras formas de leishmaniasis cutáneas, cuando las lesiones no se complican. Las lesiones causadas por la leishmaniasis cutánea zoonótica a menudo se inflaman y ulceran intensamente, tardando en curar de dos a ocho meses. Con frecuencia, son múltiples, especialmente en inmigrantes no inmunes, y acaban confluyendo y con infecciones secundarias. Son a menudo de curación lenta y pueden dejar grandes cicatrices, desfigurantes o incapacitantes. El periodo de incubación es con frecuencia inferior a cuatro meses.

La leishmaniasis cutánea por *L. aethiopica* produce sobre todo lesiones cutáneas simples y, con menor frecuencia, leishmaniasis oronasal y leishmaniasis cutánea difusa. La mayor parte de las lesiones son de evolución lenta. La ulceración es tardía o inexistente y la enfermedad tarda en curar de uno a tres años o más.

#### 1.E.2.A.3.- Leishmaniasis cutánea difusa del Viejo Mundo.

La leishmaniasis cutánea difusa es causada por *L. aethiopica* y se caracteriza por un engrosamiento muy diseminado de la piel en placas, pápulas o nódulos múltiples, especialmente en la cara y en las superficies exteriores de los miembros, que en ocasiones hacen que se asemeje a la lepra lepromatosa. No hay ulceración ni son afectadas las mucosas. La enfermedad no cura espontáneamente y tiende a haber recaídas después del tratamiento.

#### 1.E.2.A.4.- Leishmaniasis visceral del Nuevo Mundo.

En el Nuevo Mundo, la leishmaniasis visceral es endémica o esporádica. El agente etiológico es *L. chagasi*, aunque la enfermedad es clínicamente semejante a la causada por *L. infantum* y los parásitos no se distinguen por los métodos tipológicos habituales. Los principales síntomas son análogos a los de la leishmaniasis visceral del Viejo Mundo. La leishmaniasis dérmica postkala-azar es extremadamente rara.

Son muy frecuentes las infecciones asintomáticas y las formas subclínicas de la enfermedad pero puede ocurrir que, tras un largo seguimiento clínico, pacientes anteriormente considerados asintomáticos presenten afecciones importantes que progresan hacia el kala-azar clásico o se resuelven sin tratamiento específico. Factores de riesgo como la malnutrición concomitante y otras enfermedades infecciosas son, al parecer, decisivos para el pronóstico de la leishmaniasis visceral e inversamente, la leishmaniasis visceral parece tener importantes efectos en el estado nutricional.

**1.E.2.A.5.- Leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo.**

Hay una gran diversidad de manifestaciones clínicas asociadas con distintas especies de *Leishmania*, pero, como en el Viejo Mundo, las características clínicas no permiten separaciones absolutas. Los residentes en las zonas endémicas tienen nombres locales para algunas formas de la enfermedad.

La "úlcer de chiclero" es un nombre procedente de la época en que la leishmaniasis era una enfermedad profesional de los recolectores de caucho (chicle). En la actualidad va unida a la agricultura y a diversas actividades relacionadas con la silvicultura. Habitualmente, esta forma se manifiesta por un solo nódulo, pápula o úlcera cutánea, benigna y que remite espontáneamente. Su evolución es lenta pero no supera los seis meses. Por lo común se producen lesiones en la cara y las orejas (60 % de los casos); las membranas mucosas pocas veces resultan afectadas. Un porcentaje significativo de las lesiones ulcerosas de la oreja causa destrucción extensa del pabellón. El agente causal es *L. mexicana*.

La "uta" es una enfermedad que aparece a gran altitud, en los valles secos de los Andes peruanos, y se caracteriza por una o unas pocas lesiones cutáneas que suelen remitir espontáneamente y no causan metástasis. Las lesiones de las mucosas se producen sólo por contigüidad. La mayor parte de los casos afectan a niños (sobre todo de edad preescolar) y más del 80 % de los adultos que la sufren presentan cicatrices. El agente causal es *L. peruviana* en el Perú. En el Ecuador, donde existe el mismo biotopo, hay datos que parecen indicar que el agente etiológico es una variante enzimática de *L. mexicana*.

El "pian-bois" o pian bosque causa múltiples lesiones ulcerosas en el 60 % de los enfermos, con metástasis frecuentes a lo largo del sistema linfático, que producen múltiples úlceras que pueden confundirse con esporotricosis. Salvo en un caso recogido 1990, no parece que se produzcan lesiones nasofaríngeas. La curación espontánea es muy rara y las recaídas son frecuentes. El agente causal es *L. guyanensis*.

En Panamá existe una forma denominada "úlcer de Bejuco", causada por *L. panamensis*. Suele haber una sola úlcera o un pequeño número de ellas; son lesiones superficiales, con metástasis frecuentes a lo largo de los vasos linfáticos, que pueden dar lugar a nódulos secundarios, que no curan espontáneamente. Según los informes, en una proporción del 2 al 5 % de los casos, la enfermedad afecta a la mucosa nasofaríngea.

Las lesiones cutáneas primarias producidas por *L. brasiliensis* pueden ser úricas o múltiples y suelen ser más graves y más duraderas que las formas de leishmaniasis cutánea causadas

por otras especies de *Leishmania*. Es frecuente que la enfermedad se difunda a lo largo del sistema linfático y que resulten afectados los ganglios linfáticos, y la curación espontánea es rara. La reinfección no es corriente pero se produce en ocasiones: algunos pacientes presentan una segunda lesión cutánea con una localización distinta después de la curación de su infección primaria. La complicación más grave es la afección de las mucosas.

Otras especies de *Leishmania*, como *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* y *L. lainsoni* producen lesiones cutáneas simples.

#### 1.E.2.A.6.- Leishmaniasis cutánea difusa del Nuevo Mundo.

La leishmaniasis cutánea difusa del Nuevo Mundo es clínica y anatomopatológicamente análoga a la del Viejo Mundo. Sólo se ha asociado con miembros del complejo *L. mexicana*. En la República Dominicana existe un foco poco corriente, en el que todos los casos clínicos de leishmaniasis cutánea se manifiestan como leishmaniasis cutánea difusa. El parásito se ha identificado recientemente como un nuevo grupo dentro del género *Leishmania*. La leishmaniasis cutánea difusa del Nuevo Mundo comienza con la aparición de pápulas discretas que lentamente se transforman en placas infiltradas y nódulos múltiples, por lo general sin ulceración. Los nódulos son primero suaves, firmes y azulados y después escamosos y ásperos. Las infiltraciones en las cejas, la nariz y las orejas producen una facies leonina, que clínicamente no se distingue de la lepra lepromatosa. Por lo común, no hay lesiones de las mucosas. La enfermedad no cura espontáneamente y es muy resistente a todas las formas de tratamiento.

#### 1.E.2.A.7.- Leishmaniasis mucocutánea del Nuevo Mundo.

El nombre de leishmaniasis mucocutánea sólo se aplica correctamente a la enfermedad del Nuevo Mundo denominada "espundia", causada por *L. brasiliensis* o *L. panamensis* (ambas especies del subgénero *Viannia*, el cual engloba a un conjunto de especies con las características del género, y que se distribuyen por la América Tropical y Subtropical). La leishmaniasis mucocutánea causada por esas especies se caracteriza por su tendencia a producir metástasis en tejidos mucosos, por diseminación linfática o hematológica (también se observan ocasionalmente en el Sudán y raras veces en otros lugares infecciones de las mucosas causadas por distintos parásitos que, al parecer, sólo se difunden directamente a través de las zonas de contacto entre el tejido cutáneo y el mucoso. La forma sudanesa se denomina ahora leishmaniasis oronasal, para distinguirla de la forma propia del Nuevo Mundo). En pacientes con inmunosupresión se han notificado estados clínicos análogos debidos a otras especies de *Leishmania*.

La lesión cutánea primaria puede presentarse en distintas formas. Factores como su localización y tamaño determinan la evolución de la afección de las mucosas, que aparece en una proporción del 3 al 5 % de los enfermos. En los pacientes con una historia de tratamiento inadecuado y un largo periodo de cicatrización, es prácticamente inevitable que resulten afectadas las mucosas. Las lesiones de las mucosas se presentan en un plazo de dos años en el 50 % de los enfermos pero pueden aparecer hasta 30 años después o, en unos pocos pacientes, mientras sigue activa la lesión primaria cutánea. Las lesiones nasales están siempre presentes, con granuloma de la mucosa del tabique cartilaginoso anterior, obstrucción de las ventanas nasales y, más adelante, perforación con hundimiento y ensanchamiento de la nariz. Otras mucosas afectadas son, por orden de frecuencia, las de la faringe, el paladar, la laringe y el labio superior. Las mucosas son infiltradas y erosionadas por ulceraciones con una superficie granulosa; es frecuente la linfadenopatía local. En la etapa final, hay grave mutilación, con destrucción de cartílago y tejidos blandos.

La leishmaniasis de las mucosas nunca cura espontáneamente. Las infecciones bacterianas secundarias son frecuentes y pueden resultar fatales; la causa de defunción más frecuente es la neumonía intercurrente debido al paso de secreciones infectadas al tracto respiratorio.

#### **1.E.2.B.- Patología de la leishmaniasis.**

Se han observado manifestaciones muy diversas de las infecciones leishmánicas, presentando todas las variedades clínicas y geográficas una característica histológica común: la acumulación temprana de células fagocíticas mononucleares (o hiperplasia) en los tejidos invadidos. Las especies dermatrópicas producen un histiocitoma inicial en la piel, mientras que las especies viscerotrópicas provocan hiperplasia de las células reticuloendoteliales de los órganos afectados. Las alteraciones anatomopatológicas que caracterizan las diversas formas clínicas de la enfermedad reflejan el equilibrio entre la multiplicación de los parásitos, la respuesta inmunitaria del enfermo y las alteraciones degenerativas resultantes.

Las alteraciones histológicas que se producen en la leishmaniasis cutánea simple están dominadas por una hipersensibilidad retardada (con intervención celular) a los antígenos del parásito. La patología de la leishmaniasis cutánea típica del Viejo Mundo no es esencialmente distinta de la que caracteriza a las formas del Nuevo Mundo, incluida la lesión cutánea primaria que precede a la leishmaniasis mucocutánea. La patología de la leishmaniasis visceral está dominada por la supresión específica de la inmunidad con intervención celular, que permite la difusión y la multiplicación incontrolada del parásito y causa las complicaciones. Existe una buena correlación, aunque no necesariamente una relación causal, entre la hipersensibilidad retardada adquirida y la protección.

*Leishmania* vive exclusivamente en células monocíticas (monocitos, histiocitos y macrófagos). Los promastigotes que no penetran en monocitos son destruidos, probablemente por lisis con intervención del complemento. La vulnerabilidad a la lisis disminuye durante el crecimiento del microorganismo en cultivo o en el flebotomo, a medida que aumenta su capacidad de infectar. Las posibilidades de que *Leishmania* penetre en las células cuyo medio le es favorable aumentan porque se fija a esas células en múltiples localizaciones receptoras. Recientemente, se ha demostrado que las glándulas salivales de los flebotomos contienen poderosos agentes inflamatorios que aumentan la infectividad de los promastigotes en el ratón. Por último, se ha observado que los macrófagos infectados producen factores de estimulación de colonias que estimulan la aparición de células precursoras, creando así nuevas células favorables para el parásito.

Hay también varios mecanismos por los que *Leishmania* supera las características microbicidas de los fagolisosomas de los monocitos, entre ellos bombas de protones que equilibran el pH y enzimas que detoxifican los metabolitos del oxígeno y otros productos leishmanicidas. Sin embargo, el principal mecanismo de destrucción de *Leishmania* es el aumento de la producción de metabolitos del oxígeno en los macrófagos, estimulado por linfoquinas procedentes de los linfocitos activados que se generan durante la respuesta inmunitaria.

La leishmaniasis visceral puede manifestarse como una infección leve, asintomática u oligosintomática que remite espontáneamente, y sólo una pequeña proporción de las personas infectadas presentan la forma progresiva de la enfermedad. La infección que remite espontáneamente va seguida de una inmunidad duradera. Como la inmunidad prolongada requiere por lo general la presencia de antígenos, se cree que *Leishmania* (o alguno de sus antígenos) siguen presentes durante largo tiempo después de la infección original. Apoya la hipótesis de que parásitos vivos persisten en individuos aparentemente sanos, el hecho de que un número cada vez mayor de enfermos con inmunosupresión, por ejemplo, que padecen el SIDA o que están sometidos a un tratamiento inmunosupresor para el cáncer, presentan también la leishmaniasis visceral, sin que exista una historia previa conocida de leishmaniasis. Por lo tanto, hay aparentemente un estado de premunición (inmunidad e infección concurrente en equilibrio) tras la infección inicial, y la depresión de la inmunidad protectora altera el equilibrio en favor del parásito. Sobre la base de observaciones y del hecho de que, en modelos de ratones "resistentes", se observan parásitos vivos mucho después de la curación espontánea de la lesión, se ha sugerido que, en determinados casos, la leishmaniasis visceral puede considerarse una infección oportunista.

Aunque se han notificado casos ocasionales de leishmaniasis repetida (probablemente causados por el mismo microorganismo), se considera por lo general que el tratamiento con éxito de la enfermedad inicial, o la recuperación espontánea, produce una inmunidad prolongada. Esto es principalmente cierto en lo que atañe a la leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo en las zonas de alta

endemidad, donde la mayor parte de la población indígena es infectada y presenta lesiones en la infancia y nunca más durante el resto de su vida. Sobre la base de esta observación, la "leishmanización", es decir, la infección deliberada con *Leishmania* en un lugar y en un momento determinados, se convirtió en práctica común. Actualmente, la leishmanización sólo se utiliza como último recurso, cuando han fallado o resultan impracticables todas las demás medidas de lucha. Hasta el momento, no se conoce ninguna manera de prevenir la infección mediante vacunación o quimioprofilaxis. Los resultados de estudios realizados en el Brasil con *Leishmanias* muertas son alentadores pero no concluyentes, debido a la baja incidencia de la enfermedad en los grupos estudiados. Recientemente, se ha demostrado en Venezuela que la inmunoterapia por vacunación con *Leishmanias* muertas presenta posibilidades prometedoras para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

#### 1.E.2.B.1.- Patología específica.

##### 1.E.2.B.1.A.- Leishmaniasis visceral.

La hiperplasia reticuloendotelial consecutiva a la infección por *L. donovani* afecta al bazo, el hígado, la mucosa del intestino delgado, la médula ósea, los ganglios linfáticos y los otros tejidos linfoides. Muchas de esas células están muy parasitadas. La infiltración linfocítica es escasa. En el bazo y demás órganos linfoides, puede producirse atrofia de las zonas paracorticales (pulpa blanca), pero abundan los plasmocitos. Se abrevia la vida de los leucocitos y eritrocitos, lo que causa granulocitopenia y anemia. La función hepática es normal y son pocos los hepatocitos invadidos; después, disminuye la producción de protombina. Junto con la trombocitopenia, el descenso de la protombina puede acarrear grave hemorragia de las mucosas. La hipoalbuminemia está asociada con edema y otros signos de malnutrición. Puede haber diarrea a consecuencia de la parasitización intestinal, y ulceración o enteritis secundaria. En la fase avanzada son frecuentes las infecciones intercurrentes, en especial neumonía, disentería y tuberculosis, que son causa común de defunción.

La hiperglobulinemia (sobre todo inmunoglobulina G policlonal) es corriente, pero no parece tener un claro papel patológico en la leishmaniasis visceral. La activación del complemento puede contribuir a la anemia; se forman complejos inmunes, pero es rara la nefritis. En los pocos casos estudiados de curación espontánea y de leishmaniasis visceral linfática, se han observado estructuras histológicas tuberculoides y necróticas, respectivamente.

**1.E.2.B.1.B.- Leishmaniasis postkala-azar.**

Histológicamente, las variedades macular e hipopigmentada consisten en zonas aisladas de reacción granulomatosa y pocos parásitos. Las formas eritematosa y nodular, más frecuentes, presentan considerable infiltración histiocítica, edema, proliferación de capilares y abundantes parásitos.

**1.E.2.B.1.C.- Leishmaniasis cutánea sin complicaciones.**

La respuesta histológica es de dos clases: a) respuesta celular inmune, que refleja la inmunidad del huésped y sirve de base a la clasificación; y b) respuesta hística, que puede reflejar los efectos del antígeno liberado, ya que la lesión de los tejidos parece ser con frecuencia mayor de lo que cabría imputar sólo a los efectos sobre el macrófago huésped.

a) Respuesta celular inmunitaria. En las formas iniciales y en enfermos con niveles de anticuerpos persistentemente bajos, hay muchos macrófagos parasitados, algunos de ellos vacuolados y con abundantes parásitos. El infiltrado de linfocitos y plasmocitos aumenta progresivamente a medida que evoluciona la lesión y sigue siendo abundante hasta el final. La eliminación de parásitos suele ser consecutiva a la destrucción de los macrófagos huésped, ya sea en el centro de conglomerados circunscritos en la dermis, con liberación de amastigotes, o en macrófagos de la zona subepidérmica, con licuefacción de la capa basal y ulceración. Hay leucocitos polimorfonucleares en la zona necrótica y los linfocitos son abundantes en la periferia. Se produce resolución mediante la sustitución de los centros necróticos por células gigantes de Langhans y algunas células epitelioides. Los estudios citoquímicos parecen indicar que los complejos inmunes desempeñan un papel esencial en la necrosis. Las lesiones que no se necrosan se hacen crónicas y desarrollan una estructura histológica tuberculoide con muy pocos parásitos.

b) Respuesta hística. Durante el periodo de destrucción activa de parásitos, suelen observarse uno o más de los procesos agudos siguientes. Se produce edema en la dermis superficial y lesión del colágeno y la elastina, con aumento de la reticulina, seguido de fibrosis. En algunos casos, hay necrosis del colágeno o de la epidermis y a menudo es intensa la hiperplasia pseudoepiteliomatosa. En esta fase, los pequeños capilares pueden presentar proliferación o tumefacción endotelial, o puede haber vasculitis. En la fase tuberculoide posterior se obliteran a veces algunos de los pequeños vasos.

**1.E.2.B.1.D.- Leishmaniasis recidivante.**

Histológicamente, la lesión se caracteriza por un infiltrado linfocítico abundante, células gigantes y escasas células epitelioides e histiocíticas. A veces se observa necrosis fibrinoide, pero no caseificación. Los parásitos son pocos o no son visibles, pero es posible aislarlos mediante cultivo.

**1.E.2.B.1.E.- Leishmaniasis cutánea difusa.**

La histiopatología de esta afección refleja la ausencia de inmunidad de base celular, siendo en ella notables la enorme abundancia de macrófagos vacuolados y parasitados ("células espumosas"), la escasez de linfocitos y la ausencia de necrosis y ulceración. Después del tratamiento, las lesiones pueden presentar, en caso de recaída, rasgos de hipersensibilidad celular adquirida, lo cual parece ser un requisito previo para la curación completa.

**1.E.2.B.1.F.- Leishmaniasis mucocutánea.**

En la leishmaniasis mucocutánea se producen lesiones histológicas parcialmente análogas a las observadas en la leishmaniasis cutánea. Al principio, predomina una reacción celular exudativa, inespecífica, con infiltración de linfocitos, macrófagos y plasmocitos, en ocasiones asociada a reacciones necróticas y granulomatosas menores. Posteriormente, el granuloma se desarrolla en torno a la zona necrótica, con degeneración fibrinoide. Según datos recientemente obtenidos, un importante aspecto de la patogenia es la vasculitis aguda con necrosis coagulativa de las paredes de los pequeños vasos sanguíneos. En esta etapa, la lesión puede avanzar, hasta convertirse en un granuloma epitelioides (tipo tuberculoide) organizado en tubérculos o revertir a una reacción celular exudativa.

Se ha observado la presencia de inmunoglobulinas en los plasmocitos del lugar de la lesión y se ha sugerido que la causa de la necrosis podría ser la acumulación de complejos inmunes. Con frecuencia hay infiltración celular inespecífica acompañada de ulceración, que, contrariamente a lo que ocurre en la leishmaniasis cutánea, parece producirse sin necrosis de los macrófagos. Las lesiones se presentan por lo general en la piel, pero pueden afectar ulteriormente a las mucosas. El equivalente histológico de la leishmaniasis recidivante se encuentra en enfermos con las mucosas afectadas que son resistentes al tratamiento; en otras lesiones que aparecen en esos enfermos; hay sólo degeneración del colágeno, sin inflamación ni intento de reparación, lo cual es difícil de explicar. La parte más importante de la lesión se encuentra en la mucosa nasal profunda, donde se observan amastigotes en el endotelio vascular proliferante, juntamente con un importante infiltrado perivascular



*INTRODUCCION Y ANTECEDENTES* 

---

celular y con licuefacción del cartílago. Esta lesión profunda tiene escasa relación con la úlcera superficial.

Todos los datos aportados en relación con la epidemiología y aspectos clínicos de las leishmaniasis se han extraído del Informe de la O.M.S. del año 1989.

## **1.F.- Quimioterapia.**

### **1.F.1.- Quimioterapia de la Enfermedad de Chagas.**

Gran cantidad de sustancias han sido ensayadas "in vitro", en animales de experimentación y en el hombre: sales de bismuto, compuestos de iodo, compuestos arsenicales y antimoniales, derivados quinolínicos, antibióticos, fenantridinas, semicarbazonas, nitrofuranos, ácido p-aminosalicílico, emetina, diamidinas, sulfamidas, derivados imidazólicos, derivados piperacínicos y de purina, etc. (Goble, 1961; Prata, 1963; Schlemper y col., 1977; Freeman, 1975). Algunas de estas sustancias, se han usado en escasos ensayos y otras, han sido recientemente añadidas al arsenal del tratamiento de otras tripanosomiasis.

Muchos de estos productos son totalmente inactivos y algunos muestran resultados variables (quinolinas, fenantridinas, nitrofuranos, stilomicina, piperacinas e imidazoles), sin que en ninguno de los casos, se haya conseguido un tratamiento eficaz en la fase crónica de la enfermedad.

Hasta 1960, la metodología utilizada para el estudio de los efectos terapéuticos, se basaba en la reducción de la parasitemia de la fase aguda y en la disminución del índice de mortalidad de los animales parasitados.

La mayoría de los productos que poseen cierta actividad, en realidad no curan la infección, ya que sólo tienen efectos antiparasitarios frente a las formas tripomastigotas sanguíneas, mientras que frente a las formas amastigotas intracelulares, no tienen ningún efecto.

Una nueva fase en el tratamiento de la etiología de la enfermedad, se produce a partir de 1961 con dos significativas contribuciones. La primera de ellas hecha por Brener (1961) es relativa a la administración de los compuestos de cierta actividad frente a las formas circulantes del parásito.

Según Brener, el uso de estos productos por un largo periodo de tiempo, puede teóricamente permitir la erradicación de la enfermedad, por las continuas destrucciones de las formas sanguíneas del parásito, pero no de las intracelulares. En base a ello, Brener administró nitrofurazona, compuesto activo frente a los tripomastigotes ensayado ya por Packchanian en 1957.

La segunda contribución, consiste en la creación en Brasil en 1962 de un grupo de estudios para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Ribeiro-dos-Santos y col., 1981). Los participantes pretenden estandarizar métodos de trabajo para establecer criterios sobre el ensayo de los compuestos, selección de enfermos para el tratamiento, tratamiento prolongado y evaluación de

resultados. Durante este periodo, los autores estudiaron nuevas fórmulas de tratamiento, preferentemente en el hombre, en la fase aguda y crónica de la enfermedad. Esta nueva metodología se aplicó con nifurtimox, benzonidazol, nitrofurazona, L-furaltadona, furazolidona, compuestos quinolínicos, piperacínicos y metronidazol. Los resultados obtenidos identificaron dos productos que satisfacen el binomio tolerancia y efectividad: el nifurtimox y el benzonidazol.

Un mecanismo importante de transmisión de la enfermedad, se produce a través de las transfusiones sanguíneas. Los quimioterápicos que de alguna manera son efectivos frente a la enfermedad, carecen de actividad a la hora de introducirlos en los bancos de sangre como método de prevención de la transmisión del parásito.

Así, Schlemper y col. (1977), comprueban que las sustancias más activas "in vitro" e "in vivo", son incapaces de inhibir la infección con sangre conteniendo las formas tripomastigotas del parásito.

La resistencia que *T. cruzi* opone al tratamiento, puede ligarse a los resultados obtenidos por Agosin y col. (1976). Estos autores observaron que las formas epimastigotas de *T. cruzi* hidrolizan numerosas sustancias. La actividad, que es de tipo función mixta oxidasa, se incrementa por el fenobarbital y es inhibida por CO, SKF 525-A y metirapona.

El sistema de desintoxicación que frente a los compuestos enfrenta el parásito, se caracteriza por un complejo microsomal monooxigenasa unido al citocromo P-450. Este citocromo es la terminal oxidasa del NADPH, confiriéndose en un sistema que convierte gran número de sustancias liposolubles, en otras más polares.

*T. cruzi* es capaz incluso de metabolizar moléculas como la aminopirina, anilina, p-nitroanisol, 4-amino-5-imidazol carboxamida. Esta última sustancia, de potente acción leishmanicida, fue ensayada por Kidder y Nolan (1981) en cultivos de *T. cruzi*. El parásito es capaz de sintetizar Inositolmonofosfato (IMP) a partir del compuesto, que inhibe la guanildesaminasa pero no impide el crecimiento de las formas de cultivo. Sabiendo que la actividad del enzima xantinafosforibosiltransferasa es baja en *T. cruzi*, los autores suponen que la xantina presente en altas concentraciones, desintoxica el exceso de Guanina.

En vista de las peculiaridades de la enfermedad, el criterio clínico tiene grandes limitaciones durante la fase aguda y crónica. Durante la fase aguda, puede haber una regresión espontánea de las manifestaciones clínicas; durante la fase crónica, el valor del criterio clínico es aún más limitado, el daño visceral es irreversible y la regresión de las alteraciones puede ocurrir espontáneamente en algunos casos o simplemente después del tratamiento sintomático.

Algunos criterios parasitológicos, exámen directo y hemocultivo, pueden ser utilizados. El exámen directo de la sangre muestra la presencia del parásito sólo durante la fase aguda, pudiendo ser criterio de cura en ese estado. El hemocultivo incrementa la sensibilidad del diagnóstico en la fase aguda.

Según Steck (1981b), las tácticas empleadas en la quimioterapia de la enfermedad de Chagas son las siguientes:

- a) Replanteamiento de los quimioterápicos ya existentes.
- b) Búsqueda de inhibidores específicos en los procesos bioquímicos del parásito.
- c) Búsqueda de grupos químicos y estructurales que aumenten la actividad de los medicamentos utilizados.
- d) Síntesis de productos completamente nuevos.

En la actualidad se vienen realizando investigaciones en torno a los siguientes grupos químicos (además de las moléculas estudiadas por nosotros):

- A) Nitrofuranos.
- B) Naftoquinonas.
- C) Sistemas generadores de radicales libres.
- D) Imidazoles.
- E) Fenantridinas.
- F) Carbazoles.
- G) Pirazolopirimidinas.
- H) Antibióticos poliénicos cíclicos.

#### 1.F.1.A.- Nitrofuranos.

A lo largo de la historia del tratamiento de la enfermedad de Chagas, los nitrofuranos son los derivados que presentan mayor relevancia, en especial los 5-nitrofuranos.

Se considera el 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenamino)-tetrahidro-4H-tiazin-1,1-dioxido (Nifurtimox, Lampit®) como el primer preparado verdaderamente eficaz contra *T. cruzi*. Desde 1965,

este compuesto ha sido sometido a comprobaciones clínicas en más de dos mil enfermos con infección aguda, en Argentina, Brasil y El Salvador. Según Ribeiro-dos-Santos y col. (1981), la dosis recomendada para adultos debe ser de 15 mg/Kg/día, y para niños, 8-10 mg/Kg/día, durante 60, 80 ó 110 días. Numerosos autores consideran que la acción del nifurtimox se lleva a cabo por interacción con el ADN del parásito, produciéndole alteraciones estructurales irreversibles. La actividad se relaciona actualmente con la formación de intermediarios tóxicos, consecuencia de la reducción metabólica del grupo nitro.

Docampo y Stoppani (1979), demuestran que la adición de nifurtimox a cultivos de formas epimastigotas de *T. cruzi*, provoca un incremento de  $H_2O_2$  en el medio. La reducción intracelular de los nitroderivados ocurre a nivel microsomal, mitocondrial y también por la acción de enzimas solubles, tales como la diaforasa y xantina deshidrogenasa.

Bajo condiciones aeróbicas el radical del nitroderivado, es rápidamente oxidado por el oxígeno molecular, con regeneración del grupo nitro, produciéndose el anión superóxido ( $O_2^-$ ) que a su vez origina  $H_2O_2$ , ya sea espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa (Docampo y Stoppani, 1980).

Boveris y Stoppani (1977), preconizan que el principal mecanismo de defensa de *T. cruzi* contra la acumulación de los intermediarios de la reducción parcial del oxígeno, incluye las enzimas superóxido dismutasa y peroxidasa. Al carecer este organismo de catalasa, los nitrofuranos incrementan las concentraciones endoplasmáticas de  $H_2O_2$ , produciendo daños en el ADN, formación de peróxidos lipídicos y consecuentemente la lisis celular.

Pese a que el nifurtimox es efectivo, dependiendo de la cepa de *T. cruzi*, los resultados presentan gran variabilidad.

Brener y col. (1976), ensayaron nifurtimox, nitrofurazona y benzonidazol en diferentes cepas del parásito. La cepa Y mostró la mayor resistencia al tratamiento.

Haberkorn y Goennert (1977), obtienen resultados aún más dispares. Los animales inoculados con diversas cepas, presentan distintos porcentajes de curación, dando unos valores del 0% para la cepa Tulahuen y del 100% de curación para la WBH.

Haberkorn (1979), incidió en que la eficacia del nifurtimox dependía de la duración del tratamiento, siendo este parámetro más importante que de la dosis empleada.

Apt y col. (1972), demostraron que el nifurtimox presentaba un efecto marcado sobre

infecciones experimentales, y aunque la parasitemia desaparecía, persistía la infección. En infecciones humanas agudas, se comprobó que en un 25 % de los enfermos tratados, permanecía la infección desde el segundo mes hasta los 18 meses del tratamiento.

Por otra parte, parece ser que el nifurtimox posee cierta acción quimioprolifática frente a la enfermedad. Así, Cardoni y col. (1977), realizaron experiencias con ratones protegidos con nifurtimox, obteniendo un decrecimiento de la mortalidad en los animales pretratados. Ahora bien, cuando la sangre de ratones infectados se trató con el producto, no se redujo la infectividad en animales sanos, sugiriendo estos autores que la protección no depende exclusivamente de la acción tripanocida directa del nifurtimox.

Morrow y col. (1977), re infectaron animales tratados con nifurtimox, obteniendo altos porcentajes de cura. Según estos resultados, los autores propusieron que la resistencia a la reinfección, no dependía exclusivamente de la presencia del parásito en el organismo.

A pesar del potencial terapéutico de estas sustancias, en infecciones crónicas carecen de efectividad, a lo que hay que unir la toxicidad del compuesto. Cançao y col. (1975), aplicaron el producto en enfermos crónicos. El 68% de estos enfermos tuvieron que dejar el tratamiento pues presentaron reacciones adversas.

Los efectos colaterales que pueden producirse en el transcurso del tratamiento, principalmente son: pérdida de peso, náuseas y/o vómitos, neuropatías periféricas; reacciones que cesan al suprimir el tratamiento.

Otro de los derivados nitrofuranos de importancia es el trans-5-amino-3-(2-(5-nitro-2-furil)-vinil)-1,2,4-oxadiazol (SQ 18.506).

Sims y Gutteridge (1976), mostraron que el SQ 18506 no es más efectivo que el nifurtimox en infecciones experimentales. Estos autores estudiaron las transformaciones metabólicas del producto en el parásito. El grupo nitro, sufre una reducción y desnitrificación, produciéndose en el transcurso de este proceso los efectos deseados frente a *T. cruzi*. Los autores consideraron que el derivado intermediario hidroxilamino era el componente activo y propusieron tres posibles niveles de actuación:

- 1) Unión a los grupos sulfhidrilos de los enzimas.
- 2) Bloqueo del sistema de transporte electrónico.

### 3) Interacción con el ADN.

Para estos investigadores, la sustancia actúa inhibiendo el consumo de oxígeno y sugieren que posee propiedades alquilantes sobre el ADN, así como capacidad de inhibir la síntesis de ARN a nivel de la ARN polimerasa.

Sims y Gutteridge (1979), investigaron el modo de acción del SQ 18.506 en formas tripomastigotas, epimastigotas y amastigotas del parásito, especialmente a nivel del metabolismo energético, membranas y síntesis macromolecular, y en particular en la incorporación de precursores de la síntesis de ADN y ARN. Consideraron que el producto debe su efecto tripanocida a la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.

Gugliota y col. (1980), afirmaron que el primer efecto del compuesto era la inhibición de la síntesis de proteínas y no exclusivamente la síntesis de ARN.

En un estudio comparativo, Gutteridge y col. (1978), subrayaron que el SQ 18.506, presentaba mayor actividad "in vitro" que el nifurtimox, benzonidazol y metronidazol.

Actualmente, el desarrollo clínico estudia las posibles acciones mutagénicas y carcinogénicas de este producto.

#### 1.F.1.B.- Naftoquinonas.

A finales del siglo XIX, se sintetizó un derivado naftoquinónico con propiedades antitumorales y antimicrobianas, el lapachol: 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona.

Numerosos derivados pertenecientes a esta serie, han sido ensayados frente a *T. cruzi*, entre ellos los más activos son el 3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto (1,2-b)pirano-5,6-diona (Beta-lapachona) y el derivado 3-alil-Beta-lapachona.

Lopes y col. (1978), estudiaron la acción de estos derivados en formas epimastigotas y tripomastigotas del parásito; logrando una inhibición total del crecimiento y la motilidad de las formas epimastigotas, pero cuando eran incubados en presencia de suero o solución de hemoglobina, la Beta-lapachona no inhibía la motilidad.

Los derivados empleados, a excepción de la 3-alil-Beta-lapachona, no presentan actividad frente a las formas sanguíneas del parásito, causan cambios de color en la sangre y producen

precipitaciones.

Los autores sugieren que los derivados naftoquinónicos pueden ser inactivados por reducción o por interacción con las proteínas del suero. Reaccionan con la oxihemoglobina produciendo metahemoglobina.

En cambio, la 3-alil-Beta-lapachona no produce metahemoglobina, no se inactiva en presencia de sangre, pudiendo evitar la transmisión de la enfermedad por transfusión sanguínea.

Gonçalves y col. (1980), demostraron la efectividad del 3-alil-Beta-lapachona frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*. La molécula induce la desorganización de la membrana celular, alteraciones mitocondriales y de la cromatina, al aumentar la concentración de  $H_2O_2$  intracelular y los porcentajes de peroxidación lipídica.

El compuesto no es activo para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, pero sí puede prevenir la transmisión durante las transfusiones sanguíneas.

Docampo y col. (1978b) y Docampo (1979), estudiaron el mecanismo de acción de la Beta-lapachona sobre el parásito. La adición del producto, produce una inhibición de la respiración y de la oxidación de la glucosa, aumenta la concentración de  $H_2O_2$  y  $O_2$  en el medio de cultivo, incrementándose la concentración de estos tóxicos, con la adición de NADH.

El derivado alfa-lapachona: 3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto(2,3-b) pirano-5,10-diona, no produce  $H_2O_2$  en las formas epimastigotas del parásito (Boveris y col., 1977).

Según Docampo y col. (1977), la Beta-lapachona provoca alteraciones nucleares con cambios en la distribución de la cromatina, hinchazón de la mitocondria y alteraciones en el retículo endoplasmático.

#### 1.F.1.C.- Sistemas generadores de radicales libres.

En un intento de abrir un nuevo campo de posibilidades en el tratamiento de las enfermedades producidas por parásitos intracelulares, algunos autores han ensayado una serie de sistemas generadores de radicales libres.

Avila y col. (1976; 1978), estudiaron la susceptibilidad de infección de *Leishmania brasiliensis*, *Trypanosoma cruzi* y *Mycobacterium lepraemurium*, tratados con el sistema PIGO (peroxidasa, iodo, glucosa oxidasa tipo II, oxígeno).



Estos autores indican que los resultados podrían ser de aprovechamiento para la quimioterapia de los parásitos intracelulares, con un procedimiento galénico adecuado para poder llevar estas sustancias mediante sistemas lisosomatópicos dirigidos a las células parasitadas.

#### 1.F.1.D.- Imidazoles.

El único representante de este grupo que actualmente tiene aplicación en clínica, es el benzonidazol: N-bencil-2-nitro-imidazol-acetamida.

Boainain y Rassi (1979), indican que el benzonidazol (Radanil® , Rochagán®) posee apreciable actividad antiparasitaria, como demuestra el largo número de enfermos con xenodiagnósticos negativos después del tratamiento.

Según Ribeiro-dos-Santos y col. (1981), la pauta de administración utilizada para el benzonidazol, debe ser de 10 mg/kg/día para adultos y 5 mg/kg/día para niños, durante 60 días.

En el transcurso del tratamiento pueden presentarse síntomas de alergia cutánea, neuropatías periféricas, todo ello reversible al cesar el tratamiento.

Los estudios clínicos realizados por Cançao (1981), destacan la inducción de leucopenia en los enfermos debido al tratamiento con benzonidazol, pudiendo llegar a agranulocitosis. Los enfermos pueden presentar graves septicemias, teniendo que dejar el tratamiento y contrarrestar los efectos adversos con antibióticos y corticoides.

El principal mecanismo de acción del benzonidazol es a nivel de la síntesis proteica y ARN. El nifurtimox es capaz de incrementar la producción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  en *T. cruzi*, mientras que el benzonidazol no los produce, ni siquiera tras la estimulación con NADH (Moreno y col., 1981).

Según Brener y col. (1976), al igual que ocurre con el nifurtimox, la cepa Y de *T. cruzi* muestra mayor resistencia al tratamiento con benzonidazol, teniendo éste menor capacidad curativa que el nifurtimox para esta cepa.

Andrade y Figueira (1977), trataron con benzonidazol ratones infectados con las cepas peruana y colombiana de *T. cruzi* y observaron diferencias nítidas en la respuesta al tratamiento, siendo el índice de cura para la cepa peruana muy superior al de la colombiana.

En un plazo breve, se elimina la parasitemia eliminándose las formas amastigotas. Ahora bien, "in vitro" los tripomastigotes aislados son resistentes al producto pues la sangre tratada es infectiva para ratones sanos.

Otros derivados imidazólicos con posible aplicación en la enfermedad de Chagas, son el miconazol: 1-(2,4-dicloro-Beta-((2,4-diclorobenzil)-oxil)-fenetil)-imidazol, nitrato de; y el econazol: 1-(2,4-dicloro-beta-((p-clorobenzil)-oxi)-fenetil)-imidazol, nitrato de, los dos con actividad antifúngica.

Según Van den Bossche y col.(1978), el miconazol inhibe en *Candida albicans* la biosíntesis de ergosterol. En este organismo, la conversión de lanosterol a ergosterol envuelve la eliminación de grupos metilos en C-4 y C-14. El miconazol inhibe la síntesis por interferencia en una de las reacciones involucradas en la eliminación del metilo en C-14 y la formación de la estructura 5,7-dieno.

Docampo y Stoppani (1979), muestran como las células animales, que contienen mayor proporción de colessterol que de ergosterol en la membrana, son diferentes en este sentido a los protozoos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, en la que existe mayor proporción de ergosterol.

Docampo y col. (1981), observan que estos antifúngicos inhiben completamente el crecimiento de *T. cruzi* a bajas concentraciones, y que producen un decrecimiento de 5,7-diona esteroides (ej.: ergosterol), desaparece la cromatina nuclear, los parásitos se vacuolizan y disminuye la densidad a los electrones en el citoplasma. A diferencia de lo que sucede con *Candida sp.*, no se incrementan la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en *T. cruzi*.

#### 1.F.1.E.- Fenantridinas.

Los derivados de la fenantridina han sido utilizados con resultados variables en la tripanosomiasis africana en el ganado.

La actividad de esta serie, viene dada por la cuaternización del nitrógeno, un grupo amino en 7 y un fenilo en posición 9; la actividad se ve incrementada por la presencia de un segundo grupo amino, así, el bromuro de 2,7-diamino-9-fenil-10-metil-fenantridina (bromuro de dimidio) y el 3,8-diamino-6-fenil-5-etil-fenantridina (bromuro de etidio) son particularmente efectivos (Newton, 1963). Riou (1967), observa que en cultivos de formas epimastigotas de *T. cruzi* y en presencia de bajas concentraciones de bromuro de etidio, se obtienen porcentajes muy elevados de formas sin kinetoplasto (diskinetoplastos). El bromuro de etidio se intercala entre los pares de bases de la doble hélice de ADN de forma reversible, afectando a bajas concentraciones sólo al ADN del kinetoplasto (kADN). Inhibe el crecimiento de las formas de cultivo de *T. cruzi*, apareciendo el kinetoplasto en forma globosa y de tamaño reducido.

Riou (1968), estudió la cinética de fijación del producto y las variaciones cuantitativas del kADN. En cinco días desaparece el kADN y disminuye su contenido en ADN en un 70-80 %. Se sugiere que la selectividad que el bromuro de etidio posee a bajas dosis sobre el kADN, podría deberse a una penetración mayor de esta sustancia a través de la membrana del kinetoplasto y a la ausencia de histonas unidas al kADN. El bromuro de etidio inhibe la replicación del kADN, actuando así como tripanocida.

En un estudio comparativo en dos cepas de *T. cruzi*, Ucros y col. (1977), concluyen que la diskinetoplastia y la inhibición del crecimiento no están relacionadas directamente con la disminución de la respiración en el parásito.

Delain y col. (1972), de igual modo, creen que la conformación del kADN, la ausencia de histonas unidas al kADN y la selectiva permeabilidad de la membrana mitocondrial, podrían explicar la sensibilidad del kADN a algunas sustancias. Estos autores ensayaron dos agentes intercalantes del ADN, bromuro de etidio y daunoromicina, observando una torsión de la doble hilera del kADN, apareciendo estructuras arqueadas y un aumento de la densidad a los electrones del kinetoplasto.

Riou (1976), obtiene cepas resistentes al bromuro de etidio tras subcultivos prolongados con la sustancia, el kADN aparece reducido en ellos en un 30-35 % perdiendo su estructura típica. Los autores llegan a considerar que el bromuro de etidio induce la ampliación de secuencias cortas del kADN y la delección de otras. De este modo, se puede seleccionar una población preexistente de tripanosomas.

Da Costa y Poitman (1977), estudian en *Crithidia fasciculata* el efecto selectivo que ejerce el bromuro de etidio en la inhibición de la replicación del kADN. Decece el contenido en los citocromos a+a<sub>3</sub> y b, el producto induce un bloqueo de la síntesis mitocondrial y produce una fragmentación del ADN. Al disminuir el ATP por la consecuente pérdida de actividad mitocondrial, aumenta la actividad de los enzimas glucolíticos para restablecer las concentraciones de ATP.

Docampo y col. (1978a), ensayaron el Bromuro de Etidioa frente a *T. cruzi*, apareciendo un decrecimiento en el contenido en citocromos a+a<sub>3</sub> y b en los epimastigotes, y una disminución de los porcentajes de respiración endógena debida a la D-glucosa. También se ve afectada la producción de CO<sub>2</sub> a partir de acetato y de glucosa y la incorporación de acetilo en los intermediarios del ciclo de Krebs.

Cox y col. (1981), prueban en *T. brucei* la actividad tripanocida de los análogos azido fotorreactivos de bromuro de etidio. Dos análogos homómeros monoaminomonoazido presentan "in vivo"

una actividad cien veces superior cuando son activados fotolíticamente.

Estos compuestos poseen alta actividad a bajas concentraciones, de modo que las interacciones no específicas estarían muy disminuidas y por consiguiente su toxicidad también.

Dado que el bromuro de etioio no ha tenido éxito en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, los autores indican que estos estudios podrían abrir un campo de esperanza en la clínica de la enfermedad.

#### 1.F.1.F.- Carbazoles.

Entre las sustancias pertenecientes a este grupo, destacan los derivados de la ellipticina con propiedades intercalantes en el ADN y que proceden de alcaloides aislados de la familia *Solanacea*.

Bérnard y col. (1975), estudiaron en *T. cruzi* una serie de derivados de la ellipticina: 5,11-dimetil-6H-pirido (4,3-b) carbazol de propiedades antitumorales. El derivado 9-metoxi-6-metil-ellipticina, es el que presentó mayor actividad y su acción letal es comparable a la del bromuro de etidio. Según estos autores, parece ser que la acción intercalante con el ADN no es el único mecanismo de acción, puesto que la 9-hidroxi-ellipticina posee veinte veces más afinidad por el ADN que la 9-metoxi-ellipticina y sin embargo, esta última es más activa frente a *T. cruzi*.

Los estudios ultraestructurales revelan que los derivados de la ellipticina provocan alteraciones en el núcleo y en el kinetoplasto del parásito. La acción tripanocida resulta de la inhibición parcial o total de la replicación y transcripción de los genomas nucleares y mitocondriales. La incorporación de Timidina es inhibida con mayor intensidad en el kinetoplasto que en el núcleo.

Bérnard y Riou (1976), prueban estos derivados en *T. cruzi* y observan que la N-metil sustitución incrementa la actividad tripanocida, mientras que los compuestos ionizados presentan menor actividad. A nivel estructural, el kADN de los tripanosomas tratados, pierde paulatinamente su estructura típica de doble hilera, resultando estructuras arqueadas y la mitocondria hinchada. Progresivamente el kADN desaparece y la cromatina aparece irregularmente condensada en el núcleo. Según estos autores, la aparición de estructuras arqueadas en el kADN, puede ser debido a una variación de la estructura terciaria del ADN. Estos derivados se incorporan primeramente al kADN y posteriormente al ADN nuclear. Los autores explican este fenómeno indicando como posibles causas, la diferencia de permeabilidad de la membrana entre el kinetoplasto y el núcleo, con obligatoriedad del producto a acomplejarse con el ADN circular o linear, y por otra parte, la posibilidad de una mayor o menor sensibilidad a los enzimas mitocondriales o nucleares.

Bérnard y Riou (1977), estudian los efectos de la 9-hidroxi-ellipticina sobre la transcripción del ADN en *T. cruzi*. El producto inhibe la transcripción del kADN. Bérnard y Riou, piensan que el derivado actúa a nivel de sustrato, pues la inhibición es reversible al añadir ADN. Por otra parte, la elongación de la cadena se ve menos afectada que la iniciación.

Bérnard y col. (1979), observan el efecto citotóxico sobre *T. cruzi* y la inducción de la diskinetoplastia la comprueban a nivel molecular por medio de centrifugación en gradiente de densidad de CICs. Obtienen una cepa resistente por continuos subcultivos en presencia de la sustancia, no teniendo progreso los estudios en citología y a niveles moleculares al respecto.

Leon y col. (1978), realizan un estudio con el producto 1,5-dimetil-6H-pirido(4,3-b)carbazol; denominado olivacina. Este derivado produce vacuolización y engrosamiento de la mitocondria de las formas epimastigotas de *T. cruzi*, disminuye la respiración y oxidación del piruvato; produce una marcada inhibición de la síntesis proteica y una lenta aunque significativa inhibición de la síntesis de ADN, ARN y lípidos.

La olivacina no es activa "in vivo", no produce diskinetoplastia típica y no es efectiva frente a formas tripomastigotas sanguíneas.

#### 1.F.1.G.- Pirazolopirimidinas.

*Trypanosoma cruzi*, al igual que las leishmanias patógenas, tienen la capacidad de incorporar en su ARN el allopurinol: 4-hidroxi-pirazolo(3,4-d)pirimidina, mientras que los organismos superiores lo metabolizan y eliminan posteriormente.

Marr y col. (1978), muestran que *T. cruzi* metaboliza el allopurinol (HPP) convirtiéndolo en allopurinol ribonucleótido monofosfato (HPPR-MP) mediante el enzima fosforibosiltransferasa. El HPPR-MKP se transforma por la actividad adenilsuccinato sintetasa, en aminopurinol ribonucleótido monofosfato (APPR-MP) que se incorpora en el ARN como derivado trifosfato. En el hombre el allopurinol se metaboliza en un 90 % a oxipurinol y en un 10 % a allopurinol-1<sup>β</sup>-ribósido, siendo ambos excretados por orina. La adenina, inosina e hipoxantina, inhiben competitivamente la actividad tripanocida del HPP, mientras que sólo la adenina es capaz de inhibir la del APP, derivado más efectivo. Avila y col. (1981a), realizan un estudio comparativo entre *T. rangeli* y *T. cruzi* tratados con HPP. *T. rangeli* cultivado en medio LIT convencional, es resistente a altas concentraciones de HPP y de APP, mientras que cultivado en medio LIT sin adenina, es resistente al HPP pero sensible al APP. Por otra parte, *T. cruzi* es sensible a ambos derivados independientemente del medio de cultivo. Estos autores piensan que este hecho podría deberse a que

la succinato-AMP-sintetasa, implicada en la transformación de HPPR-MP a APPR-MP, posee una actividad cien veces superior en *T. cruzi* que en *T. rangeli*.

Cruz y col. (1981), observan que el allopurinol a parte de interferir en la síntesis normal del ARN, produce acumulación de lípidos en los tripanosomas y sugieren que el aminopurinol podría interferir el "pool" energético intracelular.

Avila y col. (1981b), tratan con allopurinol ratones infectados con 6 cepas de *T. cruzi*. Aprecian estos autores una marcada diferencia de sensibilidad al allopurinol entre las distintas cepas estudiadas, debido quizás a los distintos caracteres biológicos de las cepas. "In vitro", las seis cepas tienen similar sensibilidad al tratamiento. Las formas tripomastigotas aisladas de la sangre de los ratones parasitados, muestran resistencia al allopurinol y se multiplican normalmente en el medio de cultivo, tras su transformación en formas epimastigotas.

Los autores suponen que sólo las formas intracelulares son susceptibles a la sustancia, pero entre las tres formas del parásito no existen diferencias significativas en el metabolismo de las bases púricas y pirimidínicas, lo cual no explica la diferencia de acción.

Las cepas más virulentas y consecuentemente más citopáticas, presentan mayor sensibilidad al allopurinol, por tanto, según estos autores, la diferencia de acción está ligada a la mayor o menor capacidad de metabolizar el producto.

#### 1.F.1.H.- Antibióticos poliénicos cíclicos.

Este grupo está formado por moléculas de alta complejidad, con propiedades antifúngicas y debido a su alta toxicidad, su uso está restringido al ambiente hospitalario. La posible aplicación de estos antibióticos frente a *T. cruzi* está vinculada a la prevención de la transmisión de la enfermedad en las transfusiones sanguíneas.

Abitol y col. (1972), describen la acción de la anfotericina B frente a infecciones experimentales con *T. cruzi*. El producto produce la lisis de los tripanosomas y la cura de los animales, comprobándose por xenodiagnóstico después de seis meses de tratamiento.

La anfotericina B pertenece al grupo de los macrólidos antifúngicos y es un antibiótico poliénico tóxico para células eucariotas. Cruz y col. (1980), demuestran que este antifúngico puede eliminar las formas tripomastigotas sanguíneas de sangre mantenida en similares condiciones a la de los bancos de sangre. A la concentración empleada, no se produce hemólisis en periodos de tres

semanas. En cambio, la anfotericina B metil ester y la nistatina, no son efectivas frente a las formas tripomastigotas.

Estos autores subrayan que hay que tener en cuenta la alta toxicidad de la anfotericina B, pudiendo ser paliado este inconveniente al diluir la sangre diez veces durante la transfusión. De este modo, consideran que la anfotericina B puede ser un sustituto del violeta cristal en las transfusiones en zonas endémicas, ya que este colorante da a la sangre una coloración violeta, produce microaglutinaciones y potencialmente es carcinogénico.

La anfotericina B metil ester parece que estimula la respuesta inmune en los animales supervivientes a la infección, por el hecho de que en estos no se desarrolla la fase aguda de la enfermedad.

Según D'Arcy y Scott (1977), el mecanismo de acción de estos antifúngicos se debe a la selectiva unión a los esteroides de membrana, produciendo una desorganización y la consecuente pérdida del K<sup>+</sup> intracelular. Estos derivados presentan mayor afinidad por el ergosterol que por el colesterol.

#### **1.F.2.- Quimioterapia de la leishmaniosis visceral.**

Una enfermedad tan difundida y grave como la leishmaniosis ha desafiado los esfuerzos de los investigadores en la búsqueda de una quimioterapia eficaz. No hay tratamiento satisfactorio para ninguna de las formas de leishmaniasis y las expectativas son escasas. Esto es debido en parte a la reciente aplicación de la bioquímica y la inmunología al problema de las enfermedades parasitarias en general, y de la leishmaniosis en particular.

Los medicamentos que se utilizan en la actualidad para el tratamiento de la leishmaniosis visceral o kala-azar en el hombre son los siguientes:

- Compuestos antimoniales.
- Diamidinas.
- Amfotericina B.

### 1.F.2.A.- Compuestos antimoniales.

Los antimoniales fueron los primeros compuestos usados en el tratamiento de la leishmaniasis desde principios de siglo. Los antimoniales trivalentes, tanto orgánicos como inorgánicos, se mostraron generalmente muy tóxicos y fueron dando paso a los compuestos pentavalentes hacia el año 1920. Los dos compuestos de uso común son el estibogluconato sódico (Pentostam®) y el antimoniato de meglumina (Glucantime®). Estos fármacos fueron introducidos en el campo de la quimioterapia de la enfermedad, en la década de los cuarenta, siendo los elegidos para el tratamiento de la leishmaniosis debido a su gran eficacia y baja toxicidad. Estos dos medicamentos no se absorben por vía oral, por lo que deben administrarse parenteralmente, por inyección intravenosa lenta o por inyección intramuscular durante un periodo de 10 días.

La primera preparación de estibogluconato sódico probada, contenía solamente 20 mg Sb/ml (Sati 1942; Maegraith et al. 1947). La solución de Pentostam contiene 100 mg de Sb/ml y la de Glucantime 85 mg de Sb/ml. Chulay et al. (1988), estudiaron la farmacocinética de ambos medicamentos y comprobaron que era muy similar para ambos, con picos de concentración máximos de aproximadamente 10 mg/ml a las 2 horas de la dosis inicial.

La mayor parte del Sb se elimina rápidamente, sin embargo las concentraciones de Sb aumentan gradualmente durante el tratamiento, siendo de 0.04-0.08 mg/ml a las 24 horas desde la primera dosis, y de 0.19-0.33 mg/ml 24 horas después de 30 dosis. El modelo farmacocinético propuesto por estos autores para los dos compuestos está representado por una fase de absorción inicial con una vida media de 0.85 h, una fase de eliminación rápida con una vida media de 2.02 h, y una fase de eliminación lenta con una vida media de 76 h. La fase de eliminación lenta se puede relacionar "in vivo" con la conversión del Sb pentavalente en Sb trivalente, lo cual puede explicar la toxicidad asociada con los tratamientos largos y/o las altas dosis.

En estudios hechos sobre hamsters Gellhom y col. (1946), comprobaron que el estibogluconato sódico se concentra preferentemente en el bazo y no hay acumulación apreciable en hígado, riñón u otros órganos. Otto y col. (1947) aseguran que este medicamento no se acumula en los glóbulos rojos humanos.

Berman y col. (1988) tratan hamster, sin infectar o infectados con *L. donovani*, con Pentostam y posteriormente miden los niveles de Sb en suero, hígado, bazo y piel observando que los niveles de Sb en piel una hora después de la administración son más altos que los de hígado o bazo. Sin embargo, ocho horas después de haber dado el medicamento los niveles son comparables en los 3 órganos. Esto sugiere que en clínica se debe administrar la misma dosis para la leishmaniosis visceral y la cutánea.



Chulay y col. (1985a) estudiaron la ultraestructura de amastigotes de *L. donovani* antes y durante el tratamiento de 6 pacientes con estibogluconato sódico, observando una reducción en el tamaño medio, gran irregularidad de los contornos celulares y un moderado incremento en la densidad electrónica del citoplasma asociado con una gran concentración de ribosomas. Estos efectos sugieren que el medicamento afecta las funciones del transporte activo o la permeabilidad de la membrana plasmática.

Los antimoniales pentavalentes parecen tener diversos modos de acción contra *Leishmania*. Según Berman y col. (1985), inhiben los nucleótidos trifosfato de las purinas y la síntesis macromolecular.

Gambarelli y col. (1987) estudiaron la sensibilidad "in vitro" de 10 cepas de *Leishmania* (6 de *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. braziliensis guyanensis* y *L. mexicana*) al Glucantime en cultivos celulares de macrófagos de ratón; comprobando que 3 de las cepas de *L. infantum* (1 humana y dos de perro, todas ellas habían respondido al tratamiento con el medicamento) presentaron muy buena sensibilidad "in vitro" con una  $DL_{50} < 15 \mu\text{g/ml}$ . Mientras que las otras tres cepas (una aislada del bazo de un niño con kala-azar y con resistencia al tratamiento con antimoniales y dos de perro) mostraron una sensibilidad muy reducida "in vivo" e "in vitro" con una  $DL_{50} > 45 \mu\text{g/ml}$ .

A pesar de que los compuestos derivados del Sb son muy usados en el tratamiento del Kala-azar, no están exentos de toxicidad, mostrándose esta fundamentalmente a nivel del riñón y corazón. Como efectos secundarios es frecuente que aparezca dolor abdominal, hipertensión y disfunción hepática.

Veiga y col. (1985) hacen un estudio sobre 10 pacientes tratados con glucantime y pentostam, observando un mal funcionamiento del riñón durante el tratamiento, que se manifestó en una alta osmolaridad en la orina.

Kennedy y Anderson (1983) hicieron un estudio con 35 cricetos infectados con *L. donovani* y tratados con estibogluconato sódico. Comprobaron que cuando aparecían cuerpos amiloides en orina durante el tratamiento ello progresaba invariablemente al fallo renal.

En india, a 4 pacientes que no respondían al tratamiento con estibogluconato sódico, se les administró el medicamento a una dosis elevada de 30 mg/Kg diariamente, repartido en 3 dosis. Los 4 pacientes murieron, 3 de ellos debido a fallo cardíaco. Se considera que las muertes fueron debidas a la cardiotoxicidad inducida por el medicamento a esta dosis tan alta (Thakur 1986).

### 1.F.2.B.- Diamidinas.

Las diamidinas aromáticas se emplean en clínica en el caso de que se produzca resistencia al tratamiento con antimoniales. Son muy efectivas en el tratamiento del kala-azar, pero se consideran medicamentos de segunda elección debido a sus muchos y frecuentes efectos secundarios.

La pentamidina surgió a principios de los años 40 como la diamidina más segura (Steck 1974). Fue menos efectiva que la estilbamidina (Sen Gupta 1953), pero carecía de neurotoxicidad por lo que es el único compuesto utilizado.

La pentamidina no se absorbe por vía oral. El medicamento se une fundamentalmente al hígado y riñón (Launoy y col. 1960) y se excreta lentamente, el 50 % de la dosis inyectada comienza a eliminarse a los 5 días, una parte por la orina y otra parte por las heces. Se pueden detectar trazas en orina hasta 217 días después de la administración y en el riñón hasta 240 días después.

Pradinaud y col. (1985) destacan los excelentes resultados terapéuticos obtenidos en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea en la Guayana Francesa, utilizando bajas dosis y periodos cortos de tiempo.

Berman y Aikawa (1984), en experimentos "in vitro", trataron macrófagos de ratón infectados por *Leishmania donovani* con pentamidina encapsulada en membranas de glóbulos rojos ligadas a IgG (una media de 1.4  $\mu\text{g}$  de pentamidina), dando lugar a una inhibición de la multiplicación de los parásitos dentro de los macrófagos del 73 %. Sin embargo se necesitaron 27  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de pentamidina sin encapsular para conseguir resultados similares. Un exámen al microscopio electrónico 5 horas después de la fagocitosis de las membranas-IgG reveló que el 95 % de los parásitos estaban pegados a las membranas de los glóbulos rojos en los fagolisosomas.

En 1986 Berman y col. repitieron la experiencia anterior, aunque en esta ocasión "in vivo" con hamsters, inyectando la pentamidina contenida en membranas de glóbulos rojos ligadas a IgG por vía intracardiaca o intramuscular. Esta formulación eliminaba todos los parásitos del hígado a una dosis igual o superior a 1.5 mg de pentamidina/Kg de peso, aunque sólo eliminaba al 65 % de los parásitos a 3.5 mg /Kg, esta fue la mayor dosis ensayada. Cuando se administró la pentamidina contenida en membranas de glóbulos rojos pero sin ligar a IgG la actividad mostrada fue 200 veces superior a la que muestra el estibogluconato sódico libre, eliminando casi todos los parásitos del hígado y un 80% de los parásitos esplénicos. La diferencia entre la eliminación de los parásitos del hígado y del bazo probablemente se debe a la mayor captación del medicamento por el hígado (11 a 14  $\mu\text{g}/\text{g}$  de tejido) que por el bazo (2 a 3  $\mu\text{g}/\text{g}$  de tejido). El uso de esta formulación contra la leishmaniosis visceral se puede considerar para el tratamiento en clínica.

En cuanto a la toxicidad de la Pentamidina podemos considerar 4 grupos de efectos tóxicos: inmediatos, acumulativos, los debidos a una dosis excesiva, y los locales. Los efectos que siguen a la administración intravenosa son sensaciones de hormigueo o quemazón, dolor de cabeza, presión en el pecho, ansiedad, disnea, nauseas, vómitos, hipotensión, taquicardia y síncope (Hazarika 1949; Gasq y Lapeysonnie 1949; Sen Gupta 1953; Bryceson 1970).

Los efectos acumulativos que a menudo hacen preciso reducir la dosis o la frecuencia de la administración son debilidad, nauseas, vómitos y dolor abdominal que puede indicar daño pancreático (Sen Gupta 1953; Bryceson 1970; Jha 1983). Son muy marcados los efectos sobre el metabolismo de los carbohidratos. Se han descrito casos de hipoglucemia posiblemente como resultado de un daño hepático hasta en un 6 % de los pacientes (Waltzer y col., 1974) y esta puede llegar a ser irreversible y fatal (Manson-Bahr y Heisch 1956). También puede ocurrir hiperglucemia la cual puede conducir a diabetes (Bryceson 1968; Lichey y col. 1979; Jha y Sharma 1984; Neafs 1985). Los casos de pancreatitis aguda en tratamientos con pentamidina han sido descritos por Murphey y Josephs (1981).

Las dosis elevadas de Pentamidina en animales causan daño hepático, renal y depresión cerebral (Wein 1943). En el lugar donde se pone la inyección intramuscular es común que aparezca una inflamación dolorosa que puede sangrar o supurar (Bryceson y col. 1985).

#### 1.F.2.C.- Anfotericina B.

La anfotericina B es un antibiótico macrólido poliénico que actúa sobre los esteroides y fosfolípidos de las membranas celulares, efectivo contra ciertos hongos y *Leishmania* (Steck 1974).

Al igual que la Pentamidina es un medicamento de segunda elección debido a su toxicidad y requerimientos para la administración intravenosa, usándose en casos de resistencia a los compuestos antimoniales. Es inestable a pH distinto al neutro y sensible al aire y a la luz. El 90% del medicamento inyectado se une a las proteínas plasmáticas. La vida media es de 24 horas y el medicamento se excreta lentamente por la orina.

La administración repetida de la anfotericina B por infusión intravenosa tiende a producir esclerosis, lo cual obstaculiza el tratamiento. La mayoría de los pacientes experimentan rigidez durante la infusión. Además un 25 % de los pacientes desarrollan anomalías renales. El medicamento causa un defecto de permeabilidad en los túbulos distales que permiten la salida de potasio y se vuelven permeables a los iones hidrógeno, produciendo azotemia, acidosis y poliuria. Este defecto normalmente es reversible si la dosis administrada ha sido menos de 5 gramos (Burgess y

Birchall 1972). La misma proporción de pacientes desarrollan anemia debido a una depresión de la médula ósea y hemolisis. Algunos pacientes presentan anorexia y profundo malestar.

Los efectos inmediatos asociados con la infusión del medicamento son náuseas, vómitos, escalofríos y fiebre.

La anfotericina B no se emplea en la leishmaniosis cutánea producida por *L. tropica*, *L. major* o *L. mexicana*. Weinrauch y El-On (1984) demostraron la ineficacia de este medicamento sobre ratones infectados con promastigotes de *L. major* o *L. mexicana amazonensis*.

#### 1.F.2.D.- Agentes terapéuticos experimentales.

La lista de compuestos que han sido probados "in vitro" o "in vivo" como agentes terapéuticos de la leishmaniosis es muy larga. En general, su efectividad ha sido limitada, o su toxicidad excesiva, o sus requerimientos para la administración molestos. Podemos establecer tres grandes grupos:

- Pirazolopirimidinas.
- 8-aminoquinolinas.
- Compuestos con otras actividades biológicas.

##### 1.F.2.D.1.- Pirazolopirimidinas.

Estos compuestos son análogos estructurales de las purinas en las que hay un cambio del nitrógeno desde la posición 7 del anillo de la purina hasta lo que sería la posición 8. Esta alteración convierte al compuesto en una pirazolo (3,4-d)-pirimidina, y ello altera bastante su metabolización. En este grupo de compuestos incluimos:

- Alopurinol.
- Tiopurinol.
- Formicín B.

Birchall 1972). La misma proporción de pacientes desarrollan anemia debido a una depresión de la médula ósea y hemolisis. Algunos pacientes presentan anorexia y profundo malestar.

Los efectos inmediatos asociados con la infusión del medicamento son náuseas, vómitos, escalofríos y fiebre.

La anfotericina B no se emplea en la leishmaniosis cutánea producida por *L. tropica*, *L. major* o *L. mexicana*. Weinrauch y El-On (1984) demostraron la ineficacia de este medicamento sobre ratones infectados con promastigotes de *L. major* o *L. mexicana amazonensis*.

#### 1.F.2.D.- Agentes terapéuticos experimentales.

La lista de compuestos que han sido probados "in vitro" o "in vivo" como agentes terapéuticos de la leishmaniosis es muy larga. En general, su efectividad ha sido limitada, o su toxicidad excesiva, o sus requerimientos para la administración molestos. Podemos establecer tres grandes grupos:

- Pirazolopirimidinas.
- 8-aminoquinolinas.
- Compuestos con otras actividades biológicas.

##### 1.F.2.D.1.- Pirazolopirimidinas.

Estos compuestos son análogos estructurales de las purinas en las que hay un cambio del nitrógeno desde la posición 7 del anillo de la purina hasta lo que sería la posición 8. Esta alteración convierte al compuesto en una pirazolo (3,4-d)-pirimidina, y ello altera bastante su metabolización. En este grupo de compuestos incluimos:

- Alopurinol.
- Tiopurinol.
- Formicin B.

#### 1.F.2.D.1.A.- Alopurinol.

Es el 4-hidroxi pirazolo(3,4-d)pirimidina, un análogo estructural de la hipoxantina y fue introducido como un candidato dentro de los agentes antineoplásicos basándose en su parecido estructural con las purinas (Elion y col., 1963).

El alopurinol no tiene actividad antimetabólica pero actúa como sustrato de la xantina oxidasa siendo un inhibidor competitivo de la misma. Esta enzima convierte al alopurinol en oxipurinol (4,6-dihidroxipirazolo(3,4-d)pirimidina) el cual es un inhibidor más efectivo de la enzima que el sustrato (Spector 1977). A pesar de su parecido estructural, el alopurinol y su producto metabólico no se incorporan dentro de los ácidos nucleicos de los tejidos de mamíferos.

Frank y col. (1970) investigando actividades antitumorales de diversos compuestos, encontraron que el alopurinol inhibía el crecimiento de *Crithidia fasciculata*. Postularon que inhibía la conversión de ácido fólico a biopterina por inhibición de la xantina oxidasa o interfería en la biosíntesis de pirimidinas en este organismo. Una investigación posterior llevada a cabo por Pfaller y Marr (1974) demuestra que el alopurinol era un efectivo agente antileishmanico contra *L. braziliensis*. La misma investigación demuestra que ni *L. braziliensis* ni *C. fasciculata* contienen xantina oxidasa por lo que se pone en duda el mecanismo de acción postulado por Frank y col. (1970).

El alopurinol se mostró muy efectivo contra promastigotes de *L. donovani* y *L. mexicana*. Así mismo el oxipurinol fue menos activo contra *L. donovani* e inactivo contra *L. mexicana* y *L. braziliensis* (Marr y Berens 1977). Además la actividad del alopurinol era reversible por adenina, inosina e hipoxantina. Estos tres compuestos representan el "pool" metabólico disponible de muchos organismos, lo que llevó a estos investigadores a la hipótesis de que el alopurinol actuaba interrumpiendo el metabolismo de las purinas.

Este hallazgo inusual implica que el alopurinol y, quizás otras pirazolopirimidinas eran metabolizadas por estos hemoflagelados de una manera totalmente distinta a como lo hacen la mayoría de los organismos. En la misma investigación se demostró que el alopurinol podía inhibir la transformación de amastigotes hasta promastigotes, lo que sugiere que el compuesto puede ser efectivo también contra las formas intracelulares de *L. donovani*.

Otro metabolito del alopurinol es el alopurinol ribonucleósido, que fue más activo que el compuesto de partida sobre los promastigotes (Nelson y col., 1979) y amastigotes intracelulares (Berens y col., 1980). Su actividad contra las formas promastigotes fue leishmanistática más que leishmanicida.

El alopurinol ribonucleósido es convertido selectivamente hasta alopurinol ribonucleótido y 4-aminopirazolopirimidina ribonucleótido (Nelson y col., 1980; Krenitsky y col., 1980). Esta conversión metabólica no se ha visto en el hospedador. Al parecer estos metabolitos actúan como inhibidores de las enzimas que metabolizan las purinas afectando la función del ARN y reduciendo la síntesis de proteínas (Looker y col., 1983).

#### 1.F.2.D.1.B.- Tiopurinol.

Recientemente se ha visto que los análogos tio del alopurinol y sus ribonucleósidos también son efectivos. La actividad del tiopurinol (4-tiopirazolo(3,4-d)pirimidina) y del tiopurinol ribonucleósido contra los promastigotes y los amastigotes intracelulares es similar a la serie de compuestos del alopurinol.

El metabolismo de este compuesto en el hombre, aunque está poco estudiado, parece ser análogo al del alopurinol, excepto que no se ha detectado el tiopurinol ribonucleósido (Grahame y col., 1974; 1977).

El tiopurinol puede ser activado por la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa hasta el ribonucleósido monofosfato y el ribonucleósido del tiopurinol también puede ser activado por una nucleósido fosfotransferasa hasta el mismo producto. No hay conversión posterior de este a ribonucleótidos de aminopirazolopirimidinas. Esto sugiere que hay diferencias en el metabolismo entre las tio- y las hidroxipirazolopirimidinas, lo que supone un modo de acción diferente contra *Leishmania* (Marr y col., 1981).

El tratamiento de macrófagos de la línea celular P388D, infectados con *L. donovani*, reduce el número de amastigotes/célula, y los amastigotes que quedan no son viables (Marr y col., 1981).

#### 1.F.2.D.1.C.- Formicin B.

Es una pirazolopirimidina en la que hay una inversión de los átomos de carbono y nitrógeno de las posiciones 8 y 9 del anillo imidazólico (7-hidroxi-3-B-D-ribofuranosilpirazolo(4,3-d)pirimidina).

Este compuesto es un análogo estructural de los nucleósidos C de la inosina que no es fosforilado ni desdoblado por las células de mamíferos (Umezawa y col., 1967; Sheen y col., 1968).

Parece ser que la toxicidad del formicin B es baja; en ratón la  $DL_{50}$  fue aproximadamente de 1000 mg/Kg administrados cada día durante 10 días (Muller y col., 1975).

Carson y Chang (1981) demuestran la actividad leishmanioestática del formicin B sobre promastigotes de *L. donovani* y *L. mexicana*, y sobre amastigotes de *L. mexicana* en macrófagos de la línea celular J774 G8, a una concentración de 1  $\mu$ M. Cuando se aumentaba la concentración del compuesto 10 veces, la inhibición del crecimiento de los amastigotes intracelulares aumentaba de un 50 % a un 90 %, pero los macrófagos inhibían su crecimiento un 30 % lo cual es indicativo de cierta toxicidad. El formicin B reducía el número de parásitos en el hígado de hamsters infectados con *L. donovani*, cuando se daba 10 mg del medicamento 4 veces al día durante 5 días.

Berman y col. (1983) consiguen una reducción de la parasitación en hígado de hamsters infectados con *L. donovani*, del 85 al 90 % después de haber administrado el formicin B por vía oral. La eficacia del compuesto por vía oral es de 4 a 8 veces mayor que por vía intramuscular, y 4 veces superior al medicamento que se empleó como control positivo, el glucantime, también administrado por vía intramuscular. A las dosis empleadas (26  $\mu$ g/Kg/día o 104  $\mu$ g/Kg/día) no se manifestó toxicidad en médula ósea ni en los elementos formes de la sangre; la única toxicidad estadísticamente significativa en hígado fue un aumento en los niveles séricos de bilirrubina. Como consecuencia de la eficacia demostrada "in vivo" así como de su ligera toxicidad, el formicin B podría emplearse como un agente oral contra la leishmaniosis visceral.

En el mecanismo de acción del formicin B se piensa que están implicadas las mismas enzimas específicas que metabolizan al alopurinol ribonucleósido. Carson y Chang (1981) incubaron formas promastigotas de *Leishmania* con formicin B, y este era fosforilado hasta formicin B monofosfato; sin embargo no detectaron formicin A monofosfato. El formicin B monofosfato inhibía a la succino-AMP sintetasa del organismo, pero no servía como sustrato.

Nelson y col. (1982), en estudios posteriores confirman que el formicin B es un agente antileishmania, pero también demuestran que *L. donovani* convierte este compuesto en el ribonucleótido del formicin A. El ARN del parásito contenía una parte del formicin A. El ARN del parásito contenía una parte del formicin A en un enlace 3',5'-polinucleótido. Además estos investigadores encontraron que la succino-AMP-sintetasa usaba el formicin B monofosfato como un sustrato alternativo. Esto indica que la ruta metabólica en el parásito es exactamente la misma que para el alopurinol ribonucleósido.

Hay una diferencia significativa entre el formicin B monofosfato y el alopurinol monofosfato, el primero es también un sustrato de la succino-AMP-sintetasa de mamíferos y el segundo no. Por lo tanto puede haber formación de ribonucleótidos del formicin en células de mamíferos, y ello puede justificar la inhibición del crecimiento en macrófagos descrito por Carson y Chang (1981).



**1.F.2.D.2.- 8-Aminoquinoleinas.**

Mucha de la información sobre la actividad química y farmacológica de las 8-aminoquinoleinas se ha conseguido en estudios sobre malaria. Estos compuestos surgen a partir de la demostración de Ehrlich en 1891 sobre la cierta actividad plasmodicida que tenía el azul de metileno.

Steck (1976) investigó aproximadamente 800 compuestos con actividades antimaláricas, antibacterianas o con estructuras químicas peculiares, con objeto de encontrar compuestos con actividad antileishmania. Únicamente las 8-aminoquinoleinas se presentaron como una buena promesa para el tratamiento de la enfermedad.

Uno de los primeros estudios que demostraron la efectividad de las 8-aminoquinoleinas contra *Leishmania* fue realizado por Kinnamon y col. (1978). El compuesto WR6026 resultó ser entre 470 y 700 veces más activo que el antimonio de meglumina, al tratar un hamster infectado con *Leishmania* al tercer día de la infección. Si el hamster se trataba al decimoséptimo día desde el inicio de la infección, el compuesto WR6026 era sólo 160 veces más efectivo que el antimonio de meglumina.

Chapman y col. (1979) trataron con WR6026 perros infectados con *L. donovani* y consiguieron una reducción en el número de amastigotes hepáticos del 94 %, cuando el compuesto se administró por vía intramuscular a una dosis de 3.25 mg/kg por día durante 5 días.

La primaquina tiene muy poca actividad en infecciones experimentales con *L. donovani*. Las leishmaniosis cutáneas experimentales son menos sensibles a las 8-aminoquinoleinas que las leishmaniosis viscerales. Aunque la 2-metilprimaquina parece ser más activa contra *L. major* que la primaquina.

También se ha observado actividad con las 6- y 7-aminoquinoleinas, aunque menor que con las 8-aminoquinoleinas (Hanson y col., 1977).

Johnson y Werbel (1983) ensayaron la actividad sobre *L. donovani* de ciertos compuestos análogos de las quinoleinas, insertando diferentes grupos en el anillo y únicamente en el análogo 2-hidroxipropilo se observó un incremento de la actividad.

Cuando las 8-aminoquinoleinas se administran oralmente se absorben enseguida. Son metabolizadas muy rápidamente, sin embargo, sólo una pequeña proporción de la dosis administrada se excreta como tal. Las concentraciones plasmáticas máximas se dan alrededor de las 6 horas, y rápidamente disminuyen no detectándose nada a las 24 horas.

A las dosis terapéuticas ordinarias (la mayoría de las veces administradas a pacientes con malaria) la primaquina se ha mostrado relativamente inócua. Cuando el tratamiento es muy prolongado puede ocurrir dolor abdominal, anemia, cianosis y leucocitosis. En individuos deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa el medicamento puede inducir una reacción hemolítica grave.

Las 8-aminoquinoleinas aceleran la eliminación de hidrógeno del NADPH, glutatión reducido, la hemoglobina y los grupos sulfhidrilo de las proteínas. En eritrocitos normales, el índice de regeneración del NADPH puede acelerarse aumentando la cantidad de glucosa metabolizada a través de la ruta de las pentosas fosfato. Por este mecanismo se dispone de NADPH suficiente para la reducción del glutatión oxidado y para la reducción de la metahemoglobina. Los eritrocitos de individuos deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa son incapaces de regenerar el NADPH suficientemente, para compensar los efectos destructivos de los metabolitos oxidativos de las 8-aminoquinoleinas.

#### 1.F.2.D.3.- Compuestos con actividades biológicas.

Debido al alto interés que existe en la quimioterapia de *Leishmania*, se ha examinado la actividad frente a este parásito de muchos compuestos que se han usado en el hombre para el tratamiento de otras enfermedades. Entre estos tenemos:

- Compuestos antibacterianos.
- Paromomicina, monomicina y compuestos relacionados.
- Compuestos antimaláricos.
- Emetina y compuestos relacionados.
- Compuestos antitripanosómicos.
- Compuestos de diamidinas.
- Compuestos antihelmínticos.
- Compuestos antifúngicos.
- Otros agentes.

#### 1.F.2.D.3.A.- Compuestos antibacterianos.

Los compuestos antibacterianos presentaron poca o ninguna actividad "in vitro" a altas concentraciones. La actividad fue muy poca "in vivo". Cuando se administró trimetoprin junto con sulfadiazina a ratones infectados con *L. major*, la actividad no aumentó con respecto a los medicamentos por separado (Neal 1972).

Sin embargo el efecto de la rifampicina en ratones infectados con *L. mexicana amazonensis*, se potenció con la isoniazida y la amfotericina (Peters y col., 1981).

Raether y col. (1989) inocularon intravenosamente a cricetos (LAK:LVGKI) con *L. donovani* y después, estos fueron tratados oralmente con potentes fluoroquinolonas que una vez ensayadas indujeron una reducción significativa en el número de amastigotes hepáticos respecto a los lotes control.

#### 1.F.2.D.3.B.- Paromicina, monomicina y compuestos relacionados.

Neal (1968) en ensayos "in vivo" comprobó la alta actividad de la paramomicina, hidroximicina y aminosidina sobre *L. major*. La neomicina, framicitina y kanamicina fueron inactivas.

En estudios "in vitro" la paramomicina y monomicina presentaron una actividad moderada frente a amastigotes de *L. major*, y baja frente a amastigotes de *L. mexicana*. La kanamicina resultó inactiva para los amastigotes de *L. major* (Mattock y Peters 1975a).

Yusupov y col. (1981) ensayaron el efecto de la monomicina sola y de un complejo de monomicina más colágeno, sobre promastigotes de una cepa virulenta de *L. tropica* en medio NNN. En ambos casos la actividad fue elevada. El colágeno solo inhibía el crecimiento de los parásitos probablemente debido al cambio de pH que inducía en el medio.

#### 1.F.2.D.3.C.- Compuestos antimaláricos.

Ciertos compuestos usados como antimaláricos han presentado actividad. Así Mattock y Peters (1975a) en ensayos "in vitro" con amastigotes de distintas especies de *Leishmania*, observaron que compuestos como el cicloguanil, primetamina, mefloquina, mepacrina, cloroquina, quinina, clociguanil, etc. presentaban una actividad moderada o alta.

#### **1.F.2.D.3.D.- Emetina y compuestos relacionados.**

Se comprobó que la dehidroemetina tenía propiedades anti-*L. donovani*, por reducir el peso del bazo y del hígado de hamsters infectados. Sin embargo, no se correlacionó la reducción del peso de los órganos con el número de amastigotes. También el cloruro de berberine inhibía "in vitro" el crecimiento de promastigotes de *L. donovani* alrededor del 50 % (Yusupov y col., 1981). Así mismo cuando se incubó médula ósea de pacientes con kala-azar con el medicamento, no se vieron promastigotes en el medio, y el compuesto inhibía la respiración endógena y la oxidación de glucosa. Los estudios de incorporación demostraron que el cloruro de berberine inhibía la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas.

#### **1.F.2.D.3.E.- Compuestos antitripanosómicos.**

Ciertos compuestos antitripanosómicos, tales como el nifurtimox o la suramina, presentan alguna actividad antileishmánica (Mattock y Peters 1975a), esto es de esperar ya que el desarrollo intracelular de *T. cruzi* es similar al de *Leishmania*. Sin embargo no hay que olvidar los efectos tóxicos del nifurtimox.

#### **1.F.2.D.3.F.- Compuestos de diamidinas.**

A pesar de la moderada actividad antileishmania demostrada por algunos de estos compuestos (Hanson y col., 1977; Raether y col. 1978; Trotter y col. 1980) su aplicación se ve disminuida por su toxicidad.

#### **1.F.2.D.3.G.- Compuestos antifúngicos.**

Mattock y Peters (1975) en ensayos "in vitro" con amastigotes de *L. mexicana* encontraron que el Atrican presentaba actividad moderada, mientras que la 5-fluorocitosina era inactiva.

En ensayos "in vitro" con amastigotes de *L. mexicana* en macrófagos derivados de monocitos humanos, el ketoconazol inhibía el crecimiento de los parásitos así como la biosíntesis de esteroides. El mecanismo de acción para el ketoconazol contra los promastigotes puede ser el postulado para *Candida albicans*: interferencia con la permeabilidad de la membrana secundaria con una pérdida de dimetil esteroides y acumulación de 14 alfa-metil esteroides (Berman y col. 1984).

Goad y col. (1985) encuentran que los esteroides del ketoconazol inhiben el crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana mexicana*. Sus estudios demuestran que la bioquímica de los esteroides es muy parecida a la de los hongos, lo que hace aumentar el interés en los medicamentos antimicóticos como agentes quimioterapéuticos para las infecciones de *Leishmania*.

En Arabia Saudí y Venezuela se han empleado compuestos antifúngicos para el tratamiento de leishmaniosis cutáneas obteniéndose resultados positivos (El-Saalee y col. 1986; Kubba y col. 1986; Viallet y col. 1986; Borelli 1987).

Medina (1986), comprobó el potente efecto inhibitor "in vitro" del ketoconazol frente a *L. donovani*.

Beach y col. (1988) cultivaron distintas cepas de *Leishmania* en presencia de ketoconazol, itraconazol y fluconazol. En general los tres medicamentos inhibieron el crecimiento de las distintas especies y subespecies tratadas.

#### 1.F.2.D.3.H.- Otros agentes.

El metronidazol, trimetoprim más sulfametoxazol, e isoniazida asociada a rifampicina se han usado para el tratamiento de leishmaniosis cutáneas con resultados opuestos.

El metronidazol no mostró una actividad experimental significativa. Fue bastante activo "in vitro" sobre amastigotes de *L. mexicana*, pero a una concentración muy elevada, de  $10^4$   $\mu\text{g/ml}$  (Mattock y Peters 1975).

Berman y Lee (1983) recogen la actividad "in vitro" de diversos agentes antileishmania, administrados por vía oral sobre *L. tropica* en macrófagos humanos. El trimetoprim más sulfametoxazol y la isoniazida más rifampicina fueron inefectivos "in vitro". El metronidazol sólo eliminó el 30 % de los parásitos.

Weinrauch y El-On (1984) inocularon ratones con promastigotes de *L. major* o *L. mexicana amazonensis*. Después de 40 días (*L. major*) o 60 días (*L. mexicana*) se les administró rifampicina por vía oral y rifampicina asociada con anfotericina B inyectada intraperitonealmente. En ambos casos el tratamiento fue ineficaz.

Los tranquilizantes del tipo de las fenotiazinas también han presentado propiedades antileishmania "in vitro". La clorpromazina fue activa contra promastigotes y amastigotes

intracelulares, mientras que la trifluoperazina y la butaperazina fueron activas "in vitro" contra promastigotes (Pearson y col., 1981).

Pearson y col. (1984) encontraron que la clorpromazina a una concentración superior o igual a 3.12  $\mu\text{g/ml}$  reducía la viabilidad de los promastigotes de *L. donovani*. En ensayos "in vivo" la concentración leishmanicida mínima dada a los hamsters infectados con *L. donovani* fue de 13.2  $\mu\text{g/ml}$ , esta reducía el número de parásitos hepáticos un 64.2 % y los parásitos esplénicos un 67.9 %. Sin embargo esta dosis es unas 10 veces superior a la tolerada por los pacientes con tratamiento psiquiatrico lo que hace descartar su uso en el tratamiento de la leishmaniosis visceral.

En ensayos "in vitro" realizados por El-On y col. (1986) la clorpromazina fue efectiva contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*, *L. aethiopica* y *L. major*. Cuando se administró la clorpromazina junto con el antimonio de meglumina, se observó un efecto sinérgico para promastigotes de *L. donovani* y amastigotes "in vitro" de *L. major*. Mientras que no hubo efecto significativo sobre amastigotes "in vivo" de *L. major* y *L. mexicana*.

### 1.G.- Quimioterapia Lisosomatotrópica.

Con la de quimioterapia lisosomatotrópica, se pretende encauzar a los fármacos de manera que tengan cierta selectividad frente a determinados blancos celulares o subcelulares. De este modo, se evita la difusión indiscriminada de los fármacos por todos los tejidos. No sólo habría menos células afectadas, sino también, se reducirían las dosis debido a que las concentraciones intracelulares alcanzadas por este sistema, son mayores (Steck, 1981).

Las propiedades terapéuticas y tóxicas de los fármacos antiprotozoarios, pueden ser ampliamente modificadas por medio de transportadores macromoleculares.

Unida a una macromolécula, la sustancia medicamentosa pierde su difusibilidad a través de la membrana plasmática y sólo será posible su introducción en las células por endocitosis.

Durante el proceso, el complejo macromolecular queda invaginado en un fragmento de membrana plasmática, formando el fagosoma, el cual se unirá con los lisosomas que verterán sus enzimas hidrolíticas. Estos enzimas interaccionan con el complejo fármaco-transportador dejando el fármaco libre, con tal que el transportador macromolecular o la unión con el fármaco sean sensibles a las hidrolasas lisosómicas, y que la sustancia medicamentosa por sí misma sea resistente a la acción de esas hidrolasas.

El fármaco libre puede alcanzar el interior de la forma intracelular del parásito o difundir fuera del fagolisosoma, y alcanzar otros compartimentos celulares en los cuales probablemente se encuentren los parásitos.

Después de la administración parenteral, un medicamento libre alcanza rápidamente el torrente circulatorio y penetra en el interior de la mayoría de las células del organismo. Un complejo lisosomatrópico atraviesa con mayor lentitud las barreras capilares y se mantiene más tiempo con altos niveles de concentración en sangre, penetrando sólo en aquellas células que muestran una alta actividad endocítica. Como consecuencia, las células normales, sensibles al fármaco libre aunque poseedoras de baja actividad de endocitosis, serán protegidas contra las propiedades tóxicas de los fármacos antiprotozoarios.

Aunque menos tóxicos, los derivados macromoleculares deberán tener mayor acción quimioterápica sobre protozoos intra y extracelulares. Realmente, si los protozoos extracelulares endocitan activamente el complejo, la concentración intraprotzoaria del fármaco será muy alta debido al alto poder de concentración de este proceso activo de captación. La actividad quimioterápica de los fármacos lisosomatrópicos sobre los protozoos intracelulares, será por otro lado, mucho mayor si las células parasitadas se caracterizan por una alta actividad de endocitosis. Esto es cierto en la mayoría de las enfermedades protozoarias donde las células del sistema retículo endotelial son los mayores lugares de infección.

Gregoriadis (1977) en una extensa revisión, recopila gran cantidad de sistemas de transporte para la aplicación de este nuevo concepto. Como transportadores de sustancias medicamentosas, se han utilizado macromoléculas (inmunoglobulinas, albúmina, fibrinógeno, glicoproteínas, dextrano, ADN), células (eritrocitos, leucocitos, hepatocitos), sistemas sintéticos biodegradables (nylon, gel de poliacrilamida), polímeros de ácido láctico y liposomas.

Los transportadores deben ser atóxicos, biodegradables y apropiados para poder llevar variedad de sustancias.

El concepto de lisosomatropismo ha sido aplicado en el campo de la quimioterapia del cancer y se han comenzado estudios en el tratamiento de la leishmaniosis visceral, utilizando como transportador liposomas, obteniéndose resultados esperanzadores.

Después de la infección, las formas tripomastigotas de *T. cruzi* están presentes en el torrente circulatorio, posteriormente invaden el sistema vacuolar de las células, donde se transforman en formas amastigotas. Mientras *T. cruzi* permanece en sangre, es sensible a varios productos, pero es muy resistente en su fase intracelular.

Según Trouet y col. (1972), una sustancia que interfiera la replicación del ADN, puede ser peculiarmente ventajosa para interaccionar con células con alta capacidad mitótica.

Los intercalantes del ADN son sustancias muy tóxicas, pero al combinarlas con un transportador disminuye significativamente la toxicidad especialmente en músculo cardíaco, probablemente por su baja capacidad de picnocitosis.

Estos autores ensayan el complejo ADN-daunorubicina frente a diferentes células cancerosas, donde el complejo muestra un potencial citotóxico comparable al intercalante libre. El complejo administrado a animales de experimentación aumenta 2-3 veces la DL<sub>50</sub> y muestra una efectividad mayor en infecciones con células leucémicas.

Castanys y col. (1984), estudiaron la acción, en infecciones experimentales con *T. cruzi*, de tres agentes intercalantes del ADN derivados de la benzo(de)isoquinolil-1,3-diona; comprobando como la administración de estos derivados previamente intercalados con ADN, produjo una disminución de la actividad antiparasitaria, presentando los productos bajo estas condiciones, menor toxicidad para los animales tratados.

Trouet y col. (1976), tratan con el complejo ADN-bromuro de etidio a animales infectados con *T. cruzi*.

El bromuro de etidio queda liberado con la ADNsa liposomal y probablemente es resistente a los enzimas lisosomales. A bajas dosis no es efectivo, mientras que a dosis superiores disminuye la mortalidad de los ratones, pero pasado cierto tiempo reaparece la sintomatología característica de la enfermedad.

Jadin y col. (1977), realizan un estudio comparativo con *T. cruzi* y *T. brucei* tratados con bromuro de etidio intercalado con ADN.

Con la sustancia libre el tratamiento de la enfermedad de Chagas resulta ineficaz, mientras que los animales inoculados con el complejo liposomal, sobreviven y tras el estudio histológico, se aprecian pequeños quistes de amastigotes en las células.

La inoculación de la sangre de los animales tratados con el complejo, no produce infección en animales sanos.

Para *T. brucei* la administración del bromuro de etidio libre es más efectiva que el tratamiento con el complejo.



Avila y col. (1979), estudian de modo similar a los autores anteriores, el efecto terapéutico del complejo ADN-bromuro de etidio en infecciones experimentales con *T. cruzi*. Estos autores obtienen resultados distintos, ya que sólo existió actividad cuando se comenzó la administración al segundo día postinfección.

Intentan explicar estos resultados, suponiendo que los tripanosomas pueden inhibir la fusión de los lisosomas con el fagosoma y así ser inaccesible el bromuro de etidio.

Los liposomas se han presentado pues, como una promesa de sistemas de transporte de medicamentos, después de la inyección intravenosa, siendo principalmente transportados desde la circulación hasta el hígado y bazo, por lo que sería un sistema ideal de liberación del medicamento para el tratamiento de parásitos en estos órganos, como por ejemplo el caso de la leishmaniosis visceral.

Usando ratones infectados con *L. infantum*, y administrando intravenosamente estibogluconato sódico encapsulado en liposomas, se encontró que el medicamento en liposomas era más activo que el medicamento libre. Black y col. (1977) indican que la actividad aumenta más de 200 veces; mientras que New y col. (1978) encuentran un aumento de la actividad menor que la expresada por los autores anteriores.

El tratamiento de la leishmaniosis visceral también lo ha estudiado Alving y sus colaboradores. Usando hamsters infectados con *L. donovani*, y liposomas conteniendo antimoniato de meglumina inyectados intracardiamente, encontraron que el compuesto encapsulado era 300 veces más activo que el medicamento libre (Alving y col. 1978a).

Los liposomas solos no parecían mostrar toxicidad, pero las muertes debidas a la leishmaniosis eran mas frecuentes que en los controles (Alving y col. 1978b). Se demostró que este efecto se debía a una infección bacteriana que acompañaba a la leishmaniosis visceral y se podía controlar mediante la administración de tetraciclina en el agua de bebida (Alving y col. 1980).

Es importante la vía de administración de los liposomas y la mayoría de los autores han empleado la vía intravenosa. Alving y col. (1980) hicieron un estudio comparativo y mostraron que la vía intraperitoneal y la intramuscular eran igualmente eficaces que la intracardiaca en hamsters infectados, sin embargo la vía subcutánea y la oral no eran efectivas.

La tecnología de los liposomas es también válida para medicamentos no antimoniales. Alving y col. (1980) encuentran que el compuesto WR 6026 encapsulado en liposomas, es unas 1000 veces más activo que el antimoniato de meglumina libre.

La eficacia de los liposomas contra las leishmaniosis cutáneas experimentales no está muy estudiada. Panosian y col. (1984) trataron ratones infectados con *L. tropica* con anfotericina B contenida en liposomas, y no se observó un descenso significativo en el número de parásitos en los tejidos.

González, (1991) comprobó como nanopartículas de polímeros de cianoacrilato, libres ó asociadas a sustancias como la dehidroemetina ó la anfotericina B, presentaban actividad frente a formas promastigotes de *L. donovani*.

La actividad de la anfotericina B contenida en liposomas está afectada por cambios en la composición de estos (New y col. 1981).

La mayoría de los autores consideran que este tipo de experiencias necesitan evidentemente ser completadas en orden a dilucidar exactamente hacia qué sistema lisosomal (de las células del hospedador o del parásito) se dirige el complejo y también, para demostrar si es o no efectivo en la enfermedad de Chagas o en la leishmaniasis visceral.

#### 1.H.- Derivados Acridínicos.

Se ha demostrado que los colorantes acridínicos se ligan a los ácidos nucleicos mediante dos tipos de interacción (Peacocke y col. 1956):

-Mediante ligamiento fuerte.

-Mediante ligamiento débil.

a) Procedimiento por ligamiento fuerte:

Este es el observado por ejemplo entre el ADN y las 9-Amino-Acridinas. Se caracteriza porque el valor del cambio energético es de aproximadamente 6-10 kilocalorías por mol; y porque la importancia de la superficie molecular se centra en tres ciclos aromáticos planos (de 38 Armstrong de superficie), de los cuales dos ciclos solamente parecen permitir también un cierto ligamiento (Drummond y col. 1965).

Estos enlaces ponen en juego fuerzas de Van der Waals, existiendo también fuerzas de tipo electrostático, ligándose fuertemente sólo los cationes. En razón de esta interacción, la reactividad de los grupos aminos del heterociclo está disminuida; los planos de los cationes se sitúan aproximadamente de modo paralelo (con una desviación inferior a 30 grados) a los planos de las bases de los nucleótidos y perpendiculares al eje de la doble hélice; y la longitud del contorno de la doble hélice aumenta, disminuyendo por el contrario su masa por unidad de longitud (Blake y Peacocke 1968).

La representación más simple del fenómeno corresponde entonces a la inserción del catión acridinilo entre dos pares sucesivos de bases, lo que provoca un estiramiento del ADN.

Algunas precisiones sobre la situación de la molécula al observar las bases han sido ulteriormente aportadas para explicar las siguientes observaciones sobre el ligamiento (Pritchard y col., 1966):

-Este se produce en el mismo dominio que la constante de ligamiento, estando implicados menos sitios con el ARN unicitenario que con el ADN nativo.

-No está reducida a pesar de que la función amina en 9 está sustituida por largas cadenas.

El intercalamiento de la Acrídina produce una extensión local de 3,4 Amstrong de aumento de longitud del ADN (Lerman, 1961; Lerman, 1963; Lerman, 1964).

Este modelo puede parecer coherente en la medida en que permite interpretar varias propiedades de los complejos ADN-Acrídina (Gilbert y Claverie, 1967), tales como la viscosidad, propiedades ópticas y también la reactividad química (Lerman, 1963; Weill y Calvin, 1963; Van Duuren y col., 1969).

Por otra parte, parece que las características espectrofotométricas del colorante ligado, pueden ser explicadas de manera satisfactoria mediante otros modelos. Además, varios puntos quedan sin comprender, como son: a) la fuerte dependencia vis-a-vis de la fuerza iónica del medio, y b) la existencia de un estado de saturación máximo para valores de  $r$  muy inferiores a 0.5. Se llama  $r$  a la constante de asociación entre el compuesto y los iones fosfato del ADN (Gilbert y Claverie, 1967).

$$r = \frac{n}{2N}$$

$n$  = número de moléculas de compuesto

$2N$  = número de iones fosfato.

Gilbert y Claverie, (1967) interpretaron la constante de asociación máxima para la repulsión de las acridinas intercaladas e indicaron los lugares de intercalamiento preferentes (Adenina y Timina).

Todo esto ha conducido a ciertos autores (Pritchard y col., 1966) a imaginar una estructura un poco diferente al modelo de Lerman. Esta estructura está caracterizada por una inserción de la molécula de Acridina entre las bases de una misma cadena de ADN, correspondiendo a un intercalamiento extra-axial en el cual las interacciones electrostáticas entre bases y acridinas son máximas. Es necesario sin embargo, precisar que una interacción de este tipo sólo tiene lugar para valores de  $r$  inferiores a 0.2. Mientras que cuando  $r$  es superior a 0.2, se produce generalmente entonces el que una fracción substancial de acridina está ligada según un modo de ligamiento débil diferente del proceso I que acaba de ser descrito.

b) Procedimiento por ligamiento débil.

Este proceso aparece en los casos en que  $r$  es superior a 0.2 e inferior al límite de la electroneutralidad ( $r=1$ ), es decir cuando una molécula de colorante está ligada por nucleótido.

Comparativamente al proceso I, se pueden describir las características de este nuevo tipo de ligamiento aminoacridina-ADN:

-Es energéticamente muy débil.

-Es puramente electrostático.

-Es externo vis-a-vis a la doble hélice, lo que entraña interacciones entre las moléculas de colorante, viéndose implicado por los planos de los ciclos de la Acridina en una orientación que no es tan regular como la del procedimiento por ligamiento débil. Los cationes de Acridina están orientados de tal modo que los átomos de nitrógeno positivos estén situados cerca de los átomos de oxígeno negativos de los grupos fosfato (Blake y Peacocke, 1968).

En otros casos, cuando  $r$  aumenta, se puede observar el fenómeno denominado "Stacking" o "apilamiento", en el cual los heterociclos se asocian unos a otros (Bradley y col., 1959).

### 1.H.1.- Mutagenicidad de los derivados acridínicos.

El mecanismo de acción mutágena es todavía difícil de establecer en el día de hoy, habiendo sido propuestos varios modelos.

-Para Brenner (Brenner y col., 1961), la mutación proviene de la inserción de la molécula de acridina en una de las cadenas de ADN. Ello tendría lugar durante la replicación.

-Por el contrario, Lerman (1963) supone que la mutación se produce después del intercalamiento, en el momento de la recombinación.

-Sin embargo, Nasim y Brychly (1979) piensan que no es seguro que la recombinación esté realmente implicada en la producción de mutación, la cual dependería mucho más de otros procesos tales como la replicación o la reparación.

-Streisinger (Streisinger y col., 1966), supone que la mutación se produce por estabilización de regiones cortas de ADN desapareado.

Estas explicaciones no parecen, sin embargo, suficientes para aclarar de una parte, la correlación constatada entre mutagenicidad y basicidad de las acridinas (Orgel y Brenner, 1961); y de otra parte, la no mutagenicidad de aquellas acridinas del tipo de la sal del Methyl-10-Acridinium (Lerman, 1964), conocido por ligarse fuertemente al ADN.

La inserción a él no es suficiente para la mutagenicidad. Sin embargo su papel está lejos de ser negativo como indica un estudio de Lerman y Altman (1967). Este ha consistido en la medida de la cantidad de fagos mutantes producidos, en función de la cantidad de acridina introducida en el medio. Estos autores comprueban que la cantidad de fagos disminuye cuando la concentración de acridina alcanza valores de  $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  M. Peacocke ha demostrado que a la concentración de  $2 \times 10^{-5}$  M de acridina, se correspondía el óptimo para el modo de ligamiento fuerte ADN-Acridina (Blake y Peacocke, 1968). La aproximación de estos resultados pone de relieve la influencia del intercalamiento.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente indicado, Georghiou (1975) ha propuesto la interpretación siguiente: la estructura electrónica de las bases del ADN podría estar alterada fuertemente por fuerzas específicas implicadas en la formación del complejo ADN-Acridina. Sin embargo, esta hipótesis requeriría para poder ser verificada conocer mejor la naturaleza exacta de las fuerzas de atracción indicadas, así como la estructura química del complejo.

Un ejemplo de estudio de la actividad mutágena de las acridinas viene dado por un trabajo comparativo consagrado a los nematodos *Mycophage gonochorique* y *Aphelenchoides composticola* (Person y Brun, 1974).

El parásito es cultivado en el laboratorio a 20 °C sobre medio nutritivo. Los nematodos son a continuación sumergidos en una solución acuosa del agente mutágeno. Las variaciones inducidas en la longitud del nematodo se aprecian en generaciones sucesivas. De un modo general, la mutación induce un fenómeno de gigantismo.

Numerosas son las compuestos acridínicos (Acriflavina, Proflavina, Naranja de Acridina, Quinacrina) para las que se han descrito efectos mutágenos. La mutagenicidad se ha manifestado en:

#### 1.- Virus.

Frente al bacteriófago T2, la Proflavina, por ejemplo, produce mutantes diferentes según la placa con la condición de que se encuentre presente durante la replicación del virus (De Mars, 1953). La acción mutágena de esta misma molécula sobre el bacteriófago T4, ha demostrado que era más activa en presencia de la ligasa T4 defectuosa más que en presencia de la ligasa normal (Sarabhaia y Lamfrom, 1969).

Se ha estudiado también la acción de la Proflavina sobre el virus de la Poliomeilitis, y la eventual mutación  $d \rightarrow d+$  (Dulbecco y Bogt, 1958). De hecho, no se observa ninguna modificación si las células hospedadoras son expuestas al mutágeno antes de la infección por el virus  $d$ . Si por el contrario, el crecimiento viral se efectúa en presencia de la acridina, la proporción de mutantes  $d+$  aumenta de 15 a 25 veces en relación con los virus normales.

#### 2.- Bacterias.

Actuando sobre las condiciones experimentales, con el fin de resolver los problemas ligados a la permeabilidad, se ha podido describir la acción mutágena de las acridinas sobre *E. coli* (Demerec y col., 1951, Kohno y Roth, 1974; Newton y col., 1974; Sesnowitz-Horn y Aldelberg, 1968; Zampieri y Greenberg 1964,1965), *Salmonella typhimurium* (Ames y Whitfield, 1966; Eisenstark y Rosner, 1964; Kohno y Roth, 1974) y *Bacillus subtilis* (Stewart, 1968).

### 3.- Levaduras y hongos.

Se ha estudiado en particular la acción de la Amino-9-Acridina sobre *Saccharomyces cerevisiae* (Ephrussi y col., 1949; Nagai y col., 1961; Adachi, 1968). Se han estudiado también las mutaciones producidas sobre *Saccharomyces fragilis* (McClary y Bowers, 1968) y sobre *Candida albicans* (Rolemic y col., 1973).

### 4.- *Drosophila* y gusanos de seda.

La Acriflavina y el Naranja de Acridina inducen mutaciones solamente sobre el macho de *Drosophila melanogaster*, mientras que la Amino-9-Acridina aumenta la frecuencia de las mutaciones en los dos sexos (Demerec, 1949; Clark, 1953; Alderson y Khan, 1968).

En lo concerniente al gusano de seda, el Naranja de Acridina (Murakami, 1973) y la Quinacrina (Murakami, 1974) son mutágenos.

Podemos señalar al respecto que, tanto para *Drosophila* como para el gusano de seda, la recombinación no es una etapa necesaria en el hecho mutagénico y ocurre a la inversa de lo que pasa con los virus y las levaduras.

### 5.- Piantas.

Una de las plantas estudiadas ha sido el bulbo de cebolla: *Allium cepa*. Es notorio que el naranja de Acridina, el amarillo de Acridina, la Proflavina o la Trypaflavina inducen rupturas cromosómicas, aberraciones cromosómicas o mutaciones morfológicas sobre la cebolla (D'Amato, 1950; 1952; 1954; Nuti-Ronchi y D'Amato, 1961), la haba (Michaelis y Rieger, 1963) o el tomate (Buiatti y Ragazzini, 1966). Por el contrario ninguna mutación ha sido señalada sobre la cebada.

### 6.- Mamíferos.

Las Acridinas inducen cambios de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas, rupturas y/o translocaciones en los cultivos celulares principalmente de células HeLa y humanas (Allison y Paton, 1965; Ostertag y Kersten, 1965; Buchinger, 1969, 1970; Kato, 1974).

### 1.H.2.- Antimutagenicidad.

Al contrario de lo que se ha descrito, puede ocurrir que un compuesto reduzca la producción de mutantes. Se dice entonces que se trata de un antimutágeno. Entre estos compuestos las acridinas presentan esta particularidad, pudiendo citar la Amino-9-Acridina, la Quinacrina y el Naranja de Acridina. Este caracter ha sido revelado con *Saccharomyces cerevisiae* tratada con Amino-9-Acridina a la concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  (Magni y col., 1964). Del mismo modo la Quinacrina, a concentraciones de 20  $\mu\text{g/ml}$  disminuye notablemente la mutación espontánea de ciertos nitruros-sensibles de *E. coli* 12 veces lo que los nitruros resistentes (Zamenhof, 1969).

De hecho, esta actividad antimutágena, como a veces la actividad mutágena, depende de la fase del ciclo de vida donde situemos la acción. De este modo la Amino-9-Acridina es mutágena en el momento de la meiosis, y antimutágena en el momento de la mitosis (Magni y col., 1964). La explicación del fenómeno queda por tanto en el aire, no pudiéndose más que insistir en el papel aparentemente esencial de sistemas de reparación celular en los que la actividad estaría aumentada frente a la antimutagenicidad.

### 1.H.3.- Relación estructura-actividad.

Ho Chuen Hwei y col., (1961) han realizado un estudio comparado sobre el poder mutágeno de algunos compuestos aromáticos. Se puede deducir de los mismos, que la mutagenicidad depende en gran medida del número y de la posición de los ciclos aromáticos, y de la presencia de sustituyentes amino. Sin embargo un estudio más completo queda por realizar para disponer de relaciones significativas.

### 1.H.4.- Poder carcinogénico.

Las sustancias capaces de inducir un cancer en el hombre o animales de laboratorio son muy diversas: hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos homólogos, aminos aromáticos y compuestos aminados, nitrosaminas, nitrosamidas, hidrazinas, triazinas, agentes alquilantes, etc (Clayson, 1973). Diversos trabajos sugieren que muchos de estos agentes tendrían un mecanismo de acción común. Serían convertidos en el organismo en iones positivos muy reactivos que reaccionarían con la mayor parte de macromoléculas celulares (ácidos nucleicos, proteínas, etc.) para inducir un estado canceroso.



### 1.H.2.- Antimutagenicidad.

Al contrario de lo que se ha descrito, puede ocurrir que un compuesto reduzca la producción de mutantes. Se dice entonces que se trata de un antimutágeno. Entre estos compuestos las acridinas presentan esta particularidad, pudiendo citar la Amino-9-Acridina, la Quinacrina y el Naranja de Acridina. Este caracter ha sido revelado con *Saccharomyces cerevisiae* tratada con Amino-9-Acridina a la concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  (Magni y col., 1964). Del mismo modo la Quinacrina, a concentraciones de 20  $\mu\text{g/ml}$  disminuye notablemente la mutación espontánea de ciertos nitrurosensibles de *E. coli* 12 veces lo que los nitruros resistentes (Zamenhof, 1969).

De hecho, esta actividad antimutágena, como a veces la actividad mutágena, depende de la fase del ciclo de vida donde situemos la acción. De este modo la Amino-9-Acridina es mutágena en el momento de la meiosis, y antimutágena en el momento de la mitosis (Magni y col., 1964). La explicación del fenómeno queda por tanto en el aire, no pudiéndose más que insistir en el papel aparentemente esencial de sistemas de reparación celular en los que la actividad estaría aumentada frente a la antimutagenicidad.

### 1.H.3.- Relación estructura-actividad.

Ho Chuen Huei y col., (1961) han realizado un estudio comparado sobre el poder mutágeno de algunos compuestos aromáticos. Se puede deducir de los mismos, que la mutagenicidad depende en gran medida del número y de la posición de los ciclos aromáticos, y de la presencia de sustituyentes amino. Sin embargo un estudio más completo queda por realizar para disponer de relaciones significativas.

### 1.H.4.- Poder carcinogénico.

Las sustancias capaces de inducir un cancer en el hombre o animales de laboratorio son muy diversas: hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos homólogos, aminas aromáticas y compuestos aminados, nitrosaminas, nitrosamidas, hidrazinas, triazinas, agentes alquilantes, etc (Clayson, 1973). Diversos trabajos sugieren que muchos de estos agentes tendrían un mecanismo de acción común. Serían convertidos en el organismo en iones positivos muy reactivos que reaccionarían con la mayor parte de macromoléculas celulares (ácidos nucleicos, proteínas, etc.) para inducir un estado canceroso.

Sin embargo, para que una sustancia carcinógena pueda ser absorbida, transportada a su lugar de activación y metabolizada, el metabolito activo debe tener una vida media suficiente para alcanzar su lugar de acción. Además, las dificultades para superar las relaciones estructura actividad, están todavía aumentadas en la práctica por el hecho de que una sustancia carcinógena potencial puede interactuar con otros sistemas en los que el tumor aparece finalmente, ejerciendo el sistema inmune una función esencial de control. En lo concerniente a las acridinas, su poder oncogénico podría deberse a su cationización (que permitiría una combinación con grupos nucleófilos) o a su interacción directa con el ADN.

Hasta 1979, ninguna acridina simple se había revelado de forma indiscutible como capaz de inducir neoplasias (Nasim y Brichly, 1979). Así Browning (1937) no había observado ninguna malignidad después de la aplicación prolongada de Acridina y de Proflavina en ratones. Ensayos ulteriores para generar tumores en el animal (por aplicación cutánea mejor que por inyección subcutánea o intraperitoneal), utilizando Naranja de Acridina y/o amarillo de acridina, se han demostrado poco convincentes para establecer la carcinogenicidad de estos compuestos; habiendo inducido papilomas hepáticos (3 de 40) en ratones tratados por la tricaprilina, asociada al naranja de acridina, siendo su tasa de inducción próxima a la obtenida con el promotor sólo. Negativos han sido también los ensayos efectuados con la nitro-9-oxido-10-Acridina (Trainin y col., 1964; Grisold, 1968) o la Diamino-3,6-Dimethyl-2,7-Acridina (Trainin y col., 1964; Grisold y col., 1968).

Por el contrario, no se ha obtenido lo mismo con hidrocarburos policíclicos al incluirle un núcleo acridínico (Benzacridinas y Dibenzacridinas). En relación con el proceso de cancerización, existe una hipótesis según la cual existiría en la célula una información oncogenética llamada "ADN-cancerígena", la cual estaría en una parte del ADN nativo de la célula normal. Esta, en células diferenciadas de organismos superiores, estaría sólidamente bloqueada, pudiendo jugar un papel en ciertas etapas de la evolución o durante etapas iniciales del crecimiento embrionario.

La causa principal de la cancerización, sería el desbloqueo del ADN cancerígeno. Este desbloqueo se podría suponer independiente de la naturaleza del agente iniciador (radiaciones, productos químicos, virus,...). El único punto en común aparente con estos agentes, se expresa entonces en términos de cantidad de energía vehiculizada o liberada (Veljkovic y Lalovic, 1978).

Conocemos que las radiaciones ultravioleta más eficaces en la inducción de un cancer, se sitúan entre 233 y 278 nm, no presentando los compuestos con actividad carcinogénica picos de absorción entre 200 y 250 nm. Se ha establecido en función de esto, que si una substancia posee un número de carga inferior a 3,20 y su espectro muestra uno o varios picos de absorción en la región de longitud de onda comprendida entre 200 y 250 nm, debe ser considerada con fuerte probabilidad como carcinogénica.

En función de todo esto, las relaciones estructura actividad se pueden establecer sobre las Acridinas carcinogénicas más conocidas; en particular las Benzacridinas. Se comprueba, que en estas el punto más importante es la sustitución del átomo meso-12 en las Benz(a) Acridinas y 7 en las Benz(c)Acridinas. Se comprueba por ejemplo, que la metilación de las Benz(c) acridinas induce una carcinogenicidad. Existe sin embargo una excepción: la dimetil-5,7-Benz(c) acridina.

Una sustitución por largas cadenas o grupos voluminosos, conduce a compuestos de menos carcinogenicidad, que una sustitución por grupos menos voluminosos. Así la Dimetil-7,11-Benz(a)Acridina es más carcinógena que la Etil-7-Metil-11-Benz(c)Acridina.

Por el contrario una sustitución sobre el átomo de carbono 10 de las Benz(a) acridinas o 9 en las Benz(c) acridinas (posición para en razón al átomo de Nitrógeno), no es suficiente para obtener la molécula carcinógena. Sin embargo una sustitución metilo o fluoruro, aumenta la actividad de derivados ya activos. Del mismo modo, la Dimetil-7,9-Benz(c) acridina es ligeramente más activa que la Methyl-7-Benz(c)Acridina.

Por otro lado, una sustitución en posición orto con respecto al átomo de Nitrógeno (8 para las Benz(a) acridinas y 11 para las Benz(c) acridinas) disminuiría la actividad carcinógena.

Se ha estudiado también lo concerniente a la hidrogenación de ciertos dobles ligamientos en las Benzacridinas. Así la Tetrahydro-1,2,3,4-Metil-7-Dibenz(a,h)Acridina y la Tetrahydro-1,2,3,4-Metil-7-Dibenz(c,j)Acridina son mucho menos activas en la inducción de sarcomas que sus homólogos completamente insaturados.

Es necesario indicar también, que las sustituciones en el esqueleto por dos átomos de Nitrógeno, son también importantes; dependiendo entonces la actividad carcinogénica de dos factores:

-El número de átomos de Nitrógeno presentes en la molécula.

-La posición de estos átomos de nitrógeno.

#### **1.H.5.- Actividad Antitumoral.**

Como se señaló anteriormente, los hidrocarburos policíclicos aromáticos provocaban, a la vez que también podían inhibir, el desarrollo de tumores (Haddow y Robinson, 1937). Esta misma observación se ha verificado con numerosos derivados de la acridina, los cuales son por si mismos carcinógenos o no (Bun-Hoi y col., 1945; Lewis y Goland, 1948).

Más concretamente, se ha encontrado desde 1954 que la mayor parte de los derivados acridínicos que portan un sustituyente en una cadena lateral en 9 tienen propiedades antitumorales (Ledochowski, 1962).

Más de cien derivados de la Amino-9-Acridina substituidos por grupos metilo, metoxi, dimetilamino o nitro en 1,2,3 o 4; y una cadena dimetilaminoalquilamina en C9 han sido ensayados "in vitro" (cultivos celulares) y/o "in vivo" (sarcoma 180 en el ratón) (Ledochowski, 1971).

Se ha comprobado que los derivados substituidos por grupos dimetilamino son inactivos, mientras que los derivados nitro y algunos derivados metilo y metoxi son activos en ciertas pruebas.

El más interesante de estos compuestos es seguramente la Nitro-1-(dimethyl-amino-3-propylamino)-9-Acridina, también llamada Ledakrina. Siendo también su homóloga, la Nitro-1-(Dimethylamino-3-Propyl)-10-Acridanone-9, de actividad comparable. Por este motivo, parece que el poder oncostático está ligado a la obstrucción volumínica y al carácter electrón-atractor del sustituyente nitro, según la cadena lateral, facilitante de la protonación, y que interviene en la distribución del producto.

Se ha investigado cual podría ser el mecanismo de acción de las Nitro-1-Acridinas. Se pensó en primer lugar que el ligamiento fisicoquímico con el ADN era responsable de la inhibición del crecimiento celular, de la abolición de todas las biosíntesis moleculares dirigidas por el ADN y por consiguiente de la acción antitumoral (Filipski, 1975; Szimigiero, 1977).

En realidad los efectos citotóxicos de estos derivados no están ligados directamente a su interacción con el ADN, a pesar de que ella se produce. Es más bien una transformación por la activación metabólica de formas electrófilas fuertemente reactivas, capaces de atacar grupos nucleófilos de macromoléculas intracelulares que estarían en el origen de la actividad biológica. Esta activación de las Nitroacridinas implica probablemente, las conversiones multidireccionales de la cadena alifática lateral y del núcleo acridínico, que podemos resumir en un similar mecanismo de acción de estas sustancias con el de agentes alquilantes disfuncionales (Koldej, 1977).

Paralelamente a las investigaciones llevadas a cabo por el equipo de Ledochowski, un importante trabajo ha sido realizado en Nueva Zelanda por el equipo de Cain (1976). Su finalidad se dirige a la comercialización de la Amsacrina que es una Anilino-9-Acridina.

Esta molécula se liga al ADN por intercalamiento, y muestra una especificidad marcada por los pares de bases Guanosina-Citosina de los nucleótidos. Ella es activa sobre ciertos tumores tales como las leucemias y algunos linfomas. Su eficacia en el cancer de mama es baja, siendo

inactiva o muy poco activa sobre un gran número de tumores corporales humanos (Cain, 1976). Para ello se ha estudiado esencialmente la influencia de diferentes substituyentes en posiciones 4 y 5 sobre la ionización molecular que gobierna la absorción y la distribución.

Sabiendo que existe una dependencia entre la actividad antileucémica, y el carácter lipofílico de una sustancia (Cain, 1974); y sabiendo, por otro lado, que aquellos compuestos que quedan neutros en un gran dominio de pH son rápidamente absorbidos por el tracto gastrointestinal (Denny, 1984). Se ha modificado en consecuencia las estructuras para llegar al C1-921 (NSC 343499), que es considerablemente más eficaz que la Amsacrina en el tratamiento de tumores pulmonares de Lewis.

#### **1.H.6.- Actividad Antiviral.**

La actividad antiviral de las acridinas se ha puesto en evidencia de dos modos distintos:

-Por el efecto fotodinámico.

-Por la producción de interferón.

##### **1)Efecto fotodinámico:**

Las acridinas en presencia de luz y Oxígeno provocan una inactivación de los virus. Este es el efecto fotodinámico. Ejemplos típicos son la fotoinactivación del Poliovirus por la Proflavina o el Naranja de Acridina y la del virus del mosaico del Tabaco por el Naranja de Acridina

a)Poliovirus: Ledinko (1958) ha demostrado que las células HeLa infectadas por el Poliovirus, en presencia de Proflavina liberan partículas que observadas al microscopio electrónico aparecen idénticas al virus normal con capacidad infectante (Ledinko, 1958). Estas partículas presentan las mismas características de sedimentación, y poseen el mismo contenido en ácidos nucleicos que el Poliovirus normal. De su propiedad fluorescente, podemos deducir que ellas encierran las moléculas de acridina.

Por otra parte, es necesario conocer que la incorporación de la acridina en el Poliovirus no se produce más que durante el crecimiento (Mayor y Diwan, 1961). La cantidad ligada depende del contenido de acridina en el medio hasta concentraciones tóxicas para las células. La cantidad

máxima se corresponde con alrededor de doscientas moléculas de colorante por partícula, o una molécula de colorante por treinta nucleótidos. Las partículas así formadas son no infecciosas, pero en realidad la inactivación del virus tiene lugar con la acción simultánea de la luz y de la acridina. Estudios complementarios han señalado que esta fotoinactivación dependía del oxígeno presente, de la temperatura, de la concentración salina, así como de la fase del ciclo vital del virus: la acción de los fotones no era eficaz más que en periodos de crecimiento (Growther y Melrick, 1961).

#### b) Virus del Mosaico del Tabaco.

Se ha estudiado la fotosensibilización activada por el Naranja de Acridina, por una parte del virus del Mosaico del tabaco y por otra parte del ARN aislado de este mismo virus (ARN-P-VMT).

La relativa inaccesibilidad del ARN al interior del virus intacto no permite más que una inactivación incompleta, y siempre que se disponga de concentraciones muy elevadas de colorante (Sivarama-Sastry y Gordon, 1966). Ninguna modificación experimental mejora realmente esta inactivación, incluida la irradiación de la membrana proteica por la luz artificial.

Por el contrario, el ARN aislado del virus puede ser inactivado de modo considerable. En el curso de esta operación, se forman diferentes complejos entre el Naranja de Acridina y el ácido nucleico (hasta tres complejos distintos). Todos estos complejos difieren en sus propiedades. Así una concentración de  $6 \times 10^{-4}$  de Naranja de Acridina inhibía el poder infeccioso del ARN, incluso en la oscuridad (Sivarama-Sastry y Gordon, 1966).

Actualmente, es difícil de establecer con certeza el mecanismo molecular de la acción fotodinámica. Todo lo más, sabemos que la inactivación implica la destrucción preferencial de la Guanina. En efecto podemos señalar que se tiene una destrucción selectiva de la Guanosina del ARN-P-VMT por fuertes concentraciones de Naranja de Acridina acompañada de una irradiación fuerte.

#### 2) Producción de Interferón.

Varios compuestos de acridinas tales como la Trypaflavina, el Naranja de Acridina (Diederich y col., 1973), la Quinacrina y el Acranil (Glaz y col., 1973) inducen una producción de interferón en el ratón. Sin embargo, las concentraciones de Interferón producidas son muy débiles con respecto a las obtenidas con los inductores víricos o polisacarídicos.

Este no es el caso de la Carboxymethyl-10-Acridanone-9 que, por otra parte, es por este motivo un agente antiviral eficaz en los animales (Krammer y col., 1976). Además presenta otras

ventajas: debil toxicidad aguda, estabilidad, solubilidad, capacidad para provocar un interferón cuyas características son idénticas a las del Interferón producido por los virus y capacidad de detección por fluorescencia a muy débiles concentraciones en el cuerpo; pudiéndose pues determinar las cinéticas de distribución del inductor en relación con la producción de interferón. Ello induce concentraciones de interferón comparables a las obtenidas con los inductores virales más intensos. No obstante ningún resultado concreto en la terapéutica antiviral o anticancerosa se ha obtenido hasta el momento.

#### 1.H.7.- Acción Antibacteriana.

El descubrimiento de la actividad antibacteriana de las Acridinas data desde comienzos de siglo. Shiga observa en 1913, que la Proflavina y el Naranja de Acridina inhiben el crecimiento de *Bacterium typhosum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus anthracis*.

El posible mecanismo de acción antibacteriano, viene dado por el hecho de que la molécula de acridina bajo forma catiónica funciona como aceptora de electrones. Está pues en competición directa con los protones sobre un lugar aniónico de la membrana bacteriana. El elemento neutro resultante puede entonces franquear la fase lipídica de esta membrana biológica. Una vez en el interior de la bacteria, es de señalar la acción de las acridinas sobre la ARN polimerasa. Existiendo en general una buena correlación entre la inhibición de la síntesis de ARN y el índice bacteriostático de las sustancias acridínicas (Demerec, 1951).

#### 1.H.8.- Acción Antiparasitaria.

La bibliografía existente, no muestra resultados hasta el momento concluyentes en cuanto a la acción antiparasitaria de los derivados acridínicos. Los mayores estudios se han realizado sobre la Malaria.

Las primeras investigaciones sobre las Acridinas como agentes antimaláricos, se sitúan a finales de los años 20. Derivan de trabajos efectuados con el Azul de Metileno respecto al cual, Ehrlich había demostrado con anterioridad la actividad contra el Plasmodium (Ehrlich y Guttman, 1891). Continuaron con la preparación de la Quinacrina (Atebrin ®) en 1930.

Sin embargo, en razón a la toxicidad y los efectos secundarios de esta molécula, las investigaciones continuaron hacia la síntesis de la Chloroquina, emparentada con la Quinacrina. Este compuesto se ha utilizado como terapia frente al paludismo desde los años cuarenta. El descubrimiento al comienzo de los años 60 de cepas de Plasmodium resistentes a la Chloroquina, ha hecho que se

estén realizando nuevas investigaciones después de un periodo de olvido a los derivados de la Acridina, como posibles compuestos antimaláricos.

Múltiples investigaciones publicadas indican que la llave de la actividad antimalárica es la existencia de una cadena lateral situada en posición central 9 del heterociclo (Sterling, 1977). No obstante, se han realizado modificaciones estructurales que se han encaminado por la modificación de la cadena lateral, de la función Amina terminal, modificación del núcleo heterociclo, etc. En muchos de estos casos se han conseguido estructuras que disminuyen los efectos secundarios indeseables; y en otros casos se han obtenido compuestos con propiedades antiamebianas.

En relación con la tripanosomiasis americana y la leishmaniosis visceral, apenas existen trabajos bibliográficos concluyentes hasta el momento, siendo discutidos en la presente tesis los resultados que se presentan. A este respecto hay que decir, que los derivados acridínicos ensayados en la presente tesis han sido sintetizados por el Dr. Jacques Barbe, el cual siguió un proceso de modificación estructural de los compuestos iniciales, en función de los resultados aportados por nosotros.

En varias disciplinas -bacteriología, virología, parasitología, oncología- las acridinas han proporcionado medicamentos de primer orden; los cuales pueden justamente ser considerados como de referencia. Sin embargo, muchas preguntas quedan todavía sin respuesta, puesto que quedan mecanismos por elucidar, actividades por mejorar y veremos si aún por descubrir.

### 1.1.- Complejos Metálicos.

Todos los complejos metálicos en base a los cuales se ha elaborado el presente trabajo han sido sintetizados por el Dr. D. G. Craciunescu con el propósito de encontrar un agente efectivo antitumoral.

Un paso fundamental en el desarrollo de los complejos de platino como agentes antitumorales, está representado por la síntesis de complejos de Pt(II) con 1,2-diamino-ciclohexano, entre los que han sido encontrados agentes realmente efectivos en varios experimentos de sistemas tumorales. Algunos de estos complejos han sido introducidos en ensayos clínicos y al parecer se prometen como agentes antitumorales.

El metabolismo de ciertos protozoos parásitos (*Trypanosoma*, *Leishmania*) presenta cierto parecido con el de las células tumorales (Brenner 1961; Riou 1967; Filardi y col. 1978), lo que ha llevado a numerosos investigadores a ensayar la acción de agentes antitumorales sobre determinadas



especies de *Trypanosoma* y/o *Leishmania* (Osuna y col. 1983; Ruiz-Pérez y col. 1986; Mesa-Valle y col. 1989).

Según Farrell y col. (1983) algunos complejos del Pt(II) de simetría molecular "cis" desplegaban un intenso efecto antitripanosómico frente a las ratas infectadas con *Trypanosoma rhodesiense*.

Parece que la idea de buscar nuevos agentes antitripanosómicos entre los complejos metálicos de comprobada acción antitumoral, puede llevar a interesantes observaciones no sólo de las interacciones ADNk sino también hacia el diseño de medicamentos de baja toxicidad renal y/o hepática, y de elevada acción frente a las infecciones producidas por distintos protozoos tales como *T. cruzi* o *L. donovani*.

Craciunescu y col. (1986) estudiaron la actividad antitumoral y/o antitripanosómica de 2 series de complejos del Pt(II): cis-Pt(L)<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> donde L es un derivado de Tiazol y/o sulfonamida; cis-Pt(L)(X)<sub>n</sub> donde n=1 ó 2, L=1,2-diaminociclohexano y X=Anión mono o bidentado de ácidos orgánicos. Estos últimos fueron más activos que los de la serie cis-Pt(L)Br<sub>2</sub>, y estos fueron más activos cuando L=derivado de tiazol que en el caso de ser un derivado de sulfonamida (tanto frente a la infección producida por *T. brucei brucei* como por *T. congolense*).

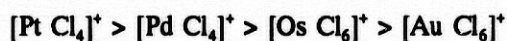
Estudios sobre los complejos con estructura: Rh<sup>III</sup>(L)<sub>3</sub> demostraron que había una relación bien definida entre la actividad antitumoral y la actividad antitripanosómica. Cuanto más potente actúa un complejo de este tipo sobre los tumores, más fuerte actuaría como agente antitripanosómico. Además la línea de infección parasitaria *T. brucei brucei* es más sensible a la actuación de estos complejos, respecto a la línea de infección parasitaria *T. congolense* (Craciunescu y col. 1987).

Otros complejos de Os(III) y Ru (III) con estructura similar a los anteriores se sintetizaron y estudiaron sus actividades antitumorales y antitripanosómicas, así como su nefrotoxicidad, por Craciunescu y col (1988). Los complejos de Os son mucho más activos que los complejos de Ru en las tres líneas de infecciones parasitarias ensayadas (*T. brucei brucei*, *T. congolense* y *T. cruzi*). *T. brucei brucei* es el más sensible frente a los dos tipos de complejos mientras que *T. congolense* es el más resistente. Por último, los complejos con ligandos ditiocarbamatos son más activos frente a los 3 parásitos que los complejos donde los ligandos son derivados de xantatos.

Otros complejos presentan sales complejas que contienen aniones estables tales como [Pt<sup>IV</sup>Cl<sub>6</sub>]<sup>2-</sup>, [Pt<sup>II</sup>Cl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>, [Os<sup>IV</sup>Cl<sub>6</sub>]<sup>2-</sup>, [Au<sup>III</sup>Cl<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, [Pd<sup>II</sup>Cl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup>. Presentando todos ellos un mecanismo de acción distinto al de otros derivados, como los cis-Pt(II) por ejemplo, debido a su distinta configuración. Sin

embargo la solubilidad en el H<sub>2</sub>O es mayor que la de los complejos neutros (Craciunescu, 1977), siendo más eficazmente absorbidos y por tanto poseen menor nefrotoxicidad en animales tratados.

Todas las sales complejas suelen ser menos eficaces como antitumorales que los complejos neutros de Pt(II), con una actividad antibacteriana muy escasa, o incluso nula frente a bacterias Gram +, y una actividad sobre los tumores distinta dependiendo del tipo de sal metálica, siendo en general la relación entre la actividad antitumoral de los distintos grupos la siguiente:



Craciunescu y col. (1989) realizan un estudio de las actividades antiparasitarias "in vivo"/"in vitro" frente a las cepas de Tripanosomas americanos y Tripanosomas africanos (*T. cruzi*, *T. gambiense*, *T. venezueliense*), desplegadas por complejos catiónicos del Rh (III), de estructura  $[\text{Rh}(\text{L})_4 \text{Cl}_2]^+ \text{Cl}^-$ , donde L=derivado de tiazol y/o derivado de benzotiazol. Llegan a la conclusión que los tripanosomas africanos son más resistentes al tratamiento con este tipo de complejos que *T. cruzi*.

Los derivados de Rh(III) son antitumorales suaves o débiles presentando una excelente actividad como antibacterianos en ensayos "in vitro" sobre Gram + (Craciunescu, 1983). Su mecanismo de acción en eucariotas, dada su estructura, no es como intercalante del ADN sino que actúan sobre determinadas enzimas mitocondriales como la GOT, GPT Y GDH (Cascales y col., 1982). Presentan valores de DL<sub>50</sub> de aproximadamente 200 mg/Kg de peso, es decir, muy superiores al del cis-DDP, y a los de otros antitumorales clásicos.

## **2.- MATERIAL Y METODOS.**

## 2. MATERIAL Y METODOS.

### 2.A. Material biológico.

#### 2.A.1. Historia y procedencia de los parásitos utilizados.

La cepa de *Leishmania donovani* empleada en nuestras experiencias ha sido la LCR-L133 (Leishmania Reference Center, Jerusalem). Procede de un caso humano de Kala-azar, aislado en 1967 en la localidad de Begemder (Etiopia), siendo mantenida en nuestro laboratorio desde 1985 mediante pases quincenales en medio NNN a 28° C.

La cepa de *Trypanosoma cruzi* utilizada para los trabajos experimentales en la presente Tesis es la cepa Maracay. Esta es de gran virulencia, aislada de un caso clínico en la División de Malariología y Sanidad Ambiental de Maracay (Venezuela) y donada por el Dr. Zozaya en 1992; siendo mantenida desde entonces mediante pases sucesivos en ratón albino de la cepa BALB/C.

#### 2.A.2. Cultivo "in vitro" de los parásitos.

Para la realización de los ensayos descritos en la presente memoria se emplearon formas promastigotas y amastigotas de *L. donovani*, y formas epimastigotas, trypomastigotas metacíclicas y amastigotas de *T. cruzi*.

La obtención de las formas amastigotas de *L. donovani* se describirá posteriormente (2.A.2.C.) al igual que la obtención de las formas metacíclicas y amastigotes de *T. cruzi* (2.A.2.B.; 2.A.2.D.).

##### 2.A.2.A. Cultivo de las formas epimastigotas de *T. cruzi* y promastigotas de *L. donovani*.

El cultivo de las formas epimastigotas de *T. cruzi* y de las formas promastigotas de *L. donovani* se realiza en medio de cultivo bifásico y posteriormente se resiembran en un medio de cultivo monofásico como a continuación se detalla.

El medio de cultivo bifásico empleado, posee como fase sólida el medio de Nicolle, Novi y MacNeal (NNN) (1908), y como fase líquida el medio MEM [20% V/V SBF1 (Suero Bovino Fetal Inactivado a 56° C durante 30 minutos)]. En este medio solidificado y estéril, se inoculan en su superficie formas flageladas de *T. cruzi* y *L. donovani*.

Una vez obtenidas las formas epimastigotas de *T.cruzi* y las promastigotas de *L. donovani*, en el NNN; se ajusta el número de parásitos a  $5 \times 10^5$  parásitos/ml en un volumen determinado; cultivándolos en medio de cultivo monofásico, que para *L. donovani* es el medio TC-199 (GIBCO) suplementado con un 30% de suero bovino fetal inactivado (SBFI), y para *T.cruzi* es el medio MTL (medio de tripanosoma líquido) (Ruiz-Pérez y col. 1986) suplementado con un 10% de SBFI.

#### 2.A.2.B. Cultivo de formas metacíclicas de *T.cruzi*.

Para la obtención de estas formas utilizamos la metodología descrita por Osuna y col. (1979, 1990) y Adroher y col. (1985). El medio de cultivo empleado es el medio Grace (GIBCO) suplementado con un 10% V/V de SBFI y 100 mEq/l de ClNa.

Los cultivos se mantienen a 28° C y aproximadamente a los 9 días el porcentaje de formas metacíclicas obtenidas oscila entre un 70% y un 90%. La diferenciación se comprueba por visualización de los parásitos al microscopio de contraste de fase, recuento en cámara hemocitométrica de Neubauer y tinción con solución acuosa de Giemsa al 10% V/V previa fijación de los parásitos con metanol durante 30 segundos.

#### 2.A.2.C. Obtención "in vitro" y cultivo de formas amastigotes de *L. donovani*.

Una vez que las formas promastigotas de *L. donovani* se encuentran en fase final de crecimiento exponencial, y comprobado que existe un número elevado de formas promastigotas metacíclicas, se centrifuga una alícuota del cultivo a 2000 rpm durante 10 minutos resuspendiéndose el botón en medio fresco TC-199 (GIBCO)(30% SBFI). El cultivo se pasa a continuación a estufa con atmósfera enriquecida al 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C.

#### 2.A.2.D. Obtención "in vitro" y cultivo de formas amastigotas de *T. cruzi*.

Una vez obtenidas las formas metacíclicas del parásito, según se indicó anteriormente (2.A.2.B.), el cultivo es centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos en centrífuga ALC (modelo 4226). Se retira el sobrenadante, resuspendiéndose en medio TC-199 fresco, y se colocan a 37° C, en atmósfera húmeda enriquecida un 5% con CO<sub>2</sub>. A los 5 días de cultivo a esta temperatura se discriminan las formas móviles de las aflageladas, transvasando el cultivo a un frasco "Steriline" y manteniéndolo a 37° C durante 24 h. Al cabo de este tiempo se retira el sobrenadante, y se añade

medio TC-199 fresco al "pellet" que se obtiene, resuspendiéndolo y transvasándolo a un recipiente de cultivo Falcon de 25 ml, manteniéndose estas formas aflageladas mientras sigamos cultivándolas a 37° C.

**2.A.2.E. Obtención de formas epimastigotas de *T. cruzi* a partir de formas amastigotas del parásito obtenidas "in vitro".**

Estas formas amastigotas cultivadas a 37° C, son purificadas en gradiente discontinuo de Percoll siguiendo la técnica descrita por Castanys y col. en 1984. Las formas purificadas, son transferidas a medio TC-199 sin suero e incubadas en estufa a 28° C.

**2.A.2.F. Obtención de formas promastigotas de *L. donovani* a partir de formas amastigotas del parásito obtenidas "in vitro".**

Se siguió la metodología indicada en el apartado anterior (2.A.2.E.).

**2.A.3. Purificación de formas metacíclicas y amastigotas por centrifugación en gradiente discontinuo de densidad de Percoll.**

Esta metodología ha sido puesta a punto a través de ensayos experimentales realizados por Castanys y col., 1984.

Mediante este procedimiento se han purificado de una parte formas metacíclicas de *T. cruzi* (obtenidas a partir de cultivos de formas epimastigotas) en medio Grace enriquecido un 10% con SBFI; y de otra parte se han purificado formas amastigotas de *T. cruzi* y de *L. donovani* obtenidas "in vitro", al objeto de discriminar éstas formas aflageladas de las formas móviles de las que proceden.

Esta purificación se realizó en gradiente discontinuo de densidad de Percoll (Pharmacia Fine Chemicals) isotonzado con sacarosa y ajustado a pH:7.4 con ClH 0.1 N.

La preparación de estos gradientes se realizó usando una solución "stock" de Percoll isotonzado con sacarosa y ajustada a pH:7.4 por la adición de ClH 0.1 N. Esto es, la solución de Percoll se preparó diluyendo 9 volúmenes de Percoll (densidad inicial 1.130 g/ml) con un volumen de sacarosa 10x (2.5 M).

Se prepararon 14 gradientes discontinuos, cada uno de 1.2 ml de volúmen:

1.150; 1.145; 1.140; 1.135; 1.130; 1.125; 1.120; 1.115; 1.110; 1.105; 1.100; 1.095; 1.090 y 1.060 g/ml.

Los parásitos, resuspendidos en la solución de Percoll de mayor densidad, son colocados en el botón de tubos de vidrio de 15 ml. Después de adicionar los gradientes, los tubos son centrifugados a 250 g durante 30 minutos a 4° C en una centrífuga Beckman (Mod. J2-21M), siendo el tiempo de aceleración de 4 minutos y el tiempo de deceleración 6 minutos.

Bandas de 0.75 ml son recogidas, transferidas a 10 ml de solución de Hanks a 4° C y centrifugadas a 200 g durante 10 minutos. Este último tratamiento es repetido una vez más a fin de eliminar la solución de Percoll.

#### **2.A.4. Determinación de la viabilidad de las formas amastigotas obtenidas "in vitro".**

La viabilidad de las formas amastigotas obtenidas se determinó mediante dos procedimientos: tinción con naranja de acridina, y determinación de la tasa de incorporación de Timidina [<sup>3</sup>H].

##### **2.A.4.A. Tinción con naranja de acridina.**

Se utilizó naranja de acridina (EGA-CHEMIE, Steinheim/Albuch. Germany) a una concentración de 15 µg/ml disuelta en medio TC-199 (30% SBFI), la cual se incubó con las formas amastigotas durante 15 minutos a 37° C, transcurrido este tiempo se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos en una centrífuga ALC-4226. Posteriormente se tomó una muestra y se sometió a recuento en cámara hemocitométrica de Neubauer, utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BH-2. El colorante naranja de acridina tiñe de verde las formas viables, y de amarillo las no viables.

##### **2.A.4.B. Determinación de la incorporación de Timidina [<sup>3</sup>H].**

Se utilizó Timidina [<sup>3</sup>H] de actividad específica 26 Ci/mM, incubándola con las formas amastigotas durante 1 h a 37° C. Después de la incubación las células fueron lavadas tres veces con medio frío con una concentración de Timidina 100 veces superior a la de Timidina [<sup>3</sup>H]. El

"pellet" conteniendo los parásitos fue tratado con Acido Tricloro Acético (TCA) (Merck) al 20%, y después de filtrarse con membranas GFC (Wathman), el TCA fue lavado con metanol (y calentado a 70° C). El material radiactivo precipitable fue solubilizado en 0.1% de Lauril Sulfato Sódico (SDS) y 0.1% de NaOH. La radiactividad fue medida en un contador de partículas  $\beta$  (BECKMAN, Palo Alto, CA, USA). Se utilizó el líquido de centelleo descrito por Byefeld y col. (1966).

#### **2.A.5. Estudio antigénico de las formas amastigotas de *L. donovani* obtenidas "in vitro".**

Las formas amastigotas de *L. donovani*, obtenidas "in vitro", fueron fijadas en acetona a -20° C, probándose su antigenicidad frente a un suero obtenido de un caso humano de kala-azar en la región mediterránea española. El título para inmunofluorescencia indirecta fue de 1/200 frente a formas promastigotas de *Leishmania* de la región. Para los ensayos de inmunofluorescencia indirecta se siguió la técnica descrita por Fritzler (1986). Tras realizar dicho ensayo los soportes celulares fueron estudiados en un microscopio Zeiss bajo campo oscuro con lámpara de mercurio HBO 200 como fuente de luz. Como filtro excitador fue utilizado el B6-12 y el K-530 de barrera.

#### **2.A.6. Mantenimiento de los tripanosomas en animales de experimentación.**

El mantenimiento de esta cepa de *T. cruzi*, se consigue mediante inoculaciones intraperitoneales a ratones sanos, de sangre procedente de ratones infectados. Aproximadamente, a los siete días post-infección se toma una muestra de sangre de la cola de los ratones mezclándola en un porta-objetos con solución Alsever (Ruiz-Pérez, 1985) en proporción 1:1 para impedir la coagulación, comprobándose microscópicamente el estado de parasitación del animal. Esta observación resulta imprescindible, pues debido al ciclo de vida de este protozoo parásito en su hospedador vertebrado, el que el animal esté parasitado no presupone, necesariamente, la presencia de las formas tripomastigotas en la sangre del hospedador.

De esta manera, se seleccionan los ratones infectados que presentan un número elevado de formas tripomastigotas en sangre. Los ratones se anestesian con eter extrayéndoles el máximo de sangre posible por punción cardiaca con jeringa estéril. La sangre obtenida se diluye al 1:1 en solución Alsever y se inoculan de 0.5 a 0.8 ml de esta solución a cada uno de los ratones que se desee infectar, procurando que el contenido sea de  $5 \times 10^5$  tripanosomas/ratón, con el fin de que adquieran niveles altos de parasitemia. La infección se practica sólo en ratones jóvenes por poseer éstos mayor predisposición para ser parasitados que los ratones adultos. Asimismo se han utilizado ratones hembra de la cepa Albino swiss, por haberse mostrado más sensibles a la infección.



Transcurridos siete días post-inoculación, estos ratones son tratados de igual forma con el fin de infectar otros nuevos animales, manteniéndose de este modo la cepa de *T. cruzi*.

Al objeto de evitar posibles infecciones accidentales, al final de cada manipulación se esteriliza todo el material usado. El término medio de vida observado en los ratones, desde el momento de la infección hasta el fallecimiento a causa de la tripanosomiasis, es de 22.4 días, observándose en el transcurso de la parasitación pérdida paulatina de la movilidad, edema facial, pérdida de pelo en la zona craneal, parálisis de los miembros posteriores y finalmente la muerte (Ruiz-Pérez, 1985).

Los animales infectados se mantienen apartados del resto de los animales sanos, así como de los posibles insectos hematófagos, con objeto de prevenir posibles infecciones del personal del laboratorio y de los animales sanos.

#### **2.A.7. Historia y procedencia de las distintas líneas celulares utilizadas en el presente trabajo.**

##### **2.A.7.A. Células HeLa.**

La línea celular HeLa (HELEN LANE), se estableció a partir de tumor de cervix uterino de una mujer de raza negra, en Febrero de 1951, por Gey y col. Posteriormente, se diagnosticó este tumor como un adenocarcinoma (Jones y col., 1971). La línea que se empleó en el presente trabajo (HeLa 229), proviene de la anterior, pero con relativamente menos sensibilidad a polivirus (Hay y col., 1988).

El medio de cultivo que recomienda la ATCC® es el medio MEM (Eagle), con solución de aminoácidos no esenciales y Hank's BSS al 70%, 20% de suero humano, 10% de extracto de levadura, y libre de antibióticos. En nuestro laboratorio se viene cultivando en el medio de cultivo MEM.

Las células utilizadas en nuestras experiencias provienen de una cepa mantenida en los laboratorios FLOW, y donadas a nuestro Centro por el Instituto de Investigaciones Citológicas de Valencia en el año 1976, a partir de la cual se mantienen en nuestro laboratorio.

#### **2.A.7.B. Células VERO.**

La línea celular Vero se estableció a partir de fibroblastos de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aetiops*), por Yasumura y Kawakita (1963) (Hay y col. 1988).

En cuanto al medio de cultivo recomendado por la ATCC®, es el TC-199 suplementado con 5% de SBFI, medio empleado por nosotros junto al medio MEM anterior, que también da excelentes resultados.

Como medio de congelación seguimos las recomendaciones de la ATCC®, usando el medio MEM más un 5% de Dimetilsulfóxido (DMSO).

#### **2.A.7.C. Macrófagos J-774A.1.**

La línea de macrófagos J-774A.1, fue establecida por Ralph (Hay y col., 1988) del SALK INSTITUTE de San Diego (USA), en 1968 y adaptada a cultivo a partir de un tumor de hembra de ratón BALB/c. Esta línea celular exhibe anticuerpos dependientes de fagocitosis y muestra receptores para ganmaglobulinas y complemento.

El medio recomendado por la ATCC®, para su cultivo es el medio de Dulbecco modificado con medio de Eagle 90% más un 10% de SBFI, pero en nuestro laboratorio se viene empleando RPMI 1640 (GIBCO®) con L-glutamina, enriquecido con un 10% (V/V) de Suero Bovino Fetal Inactivado (SBF. SIGMA CHEMICAL). El pH del medio se ajusta a 7,2 y se estabiliza con Heps 1M.

#### **2.A.7.D. Macrófagos RAW 264.7.**

En cuanto a este tipo de macrófagos, la línea fue establecida por Raschke, en LA JOLLA CANCER RESEARCH FOUNDATION, de La Jolla (USA) y obtenida del líquido ascítico de un tumor provocado en una hembra de ratón tras la inyección intraperitoneal del virus Abelson de la leucemia (A-MuLV). Al igual que en la línea de macrófagos anterior ésta también presenta en su superficie receptores para ganmaglobulinas y complemento.

Como medio de cultivo y a pesar de las recomendaciones de la ATCC®, que aconseja el mismo de Dulbecco modificado que en el caso de los macrófagos J-774A.1, se viene empleando RPMI 1640 (GIBCO®) con L-glutamina, suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal Inactivado.

#### **2.A.7.E. Otras células utilizadas.**

Se emplearon, macrófagos peritoneales de ratón albino (Swiss OF-1), obtenidos de acuerdo con Díaz-Rivadeneira (1993), colocándose en los frascos de cultivo y lavándose pasadas 2 h, con lo que seleccionamos la población de células adherentes (macrófagos mayoritariamente).

Como medio de cultivo se ha utilizado RPMI 1640 (GIBCO®) con L-glutamina (pH ~7,2).

#### **2.A.8 Mantenimiento de las líneas celulares en el laboratorio.**

El mantenimiento de las líneas celulares empleadas en este trabajo se ha realizado de acuerdo con lo indicado por Freshney (1989).

#### **2.A.9. Cultivo de los parásitos sobre células.**

Los cultivos de las diferentes líneas celulares han sido realizados en frascos Roux (NUNC) de 25 cm<sup>2</sup> de área o bien en placas de microtitulación (NUNC), de fondo plano estériles, especiales para el cultivo de tejidos. En éste último caso tras cortar a la medida de un receptáculo unos cubre-objetos de vidrio borosilicado (Menzel-Glasser), una vez desengrasados se esterilizaron en autoclave a 120° C durante 20 minutos. Los cubre objetos se colocaron en los pocillos de la placa de microtitulación con ayuda de unas pinzas estériles de punta fina. Una vez las células adheridas al sustrato, fueron empleadas como fuente de estudio de infectividad o multiplicación de los parásitos tratados con los diferentes compuestos ensayados.

Para los estudios de infectividad de las formas metacíclicas obtenidas "in vitro" de *T. cruzi*, se utilizaron células Vero.

Los estudios de infectividad de las formas promastigotas de *L. donovani* y de las formas amastigotas obtenidas "in vitro", se han realizado utilizando macrófagos J-774A.1..

La relación parásito-célula fue en todos los casos 1:1, salvo cuando se trabajó con formas amastigotas obtenidas "in vitro" en cuyo caso la relación fue 3:1.

Tanto los frascos Roux como las placas de microtitulación son mantenidos en el incubador automático de CO<sub>2</sub> (ASSAB), regulado a 37° C con una atmósfera húmeda enriquecida con

el 5% de CO<sub>2</sub>, durante un periodo de interacción de 6 horas. Transcurrido este tiempo se realizan 3 lavados con solución de Hank a 37° C, al objeto de retirar los parásitos que no habían penetrado comprobándose al microscopio de contraste de fase la ausencia de parásitos extracelulares.

Tras el último lavado, se añade medio de cultivo (MEM suplementado con un 20% de SBFi en el caso de las células HeLa o Vero; y RPMI suplementado con un 10% de SBFi en el caso de las líneas celulares de origen linfoide).

Para interrumpir los cultivos, se retira el medio y con ayuda de unas pinzas se cogen los cubre-objetos en los que están adheridas las células, se lavan con solución de Hank, se fijan con metanol durante 30 segundos y finalmente se someten a tinción con Giemsa modificado (10%), durante 30 minutos.

Los cubre-objetos, una vez teñidos y pegados a los porta-objetos, son preparados para la observación al microscopio óptico mediante el medio de montaje Depex.

#### **2.B. Evaluación "in vitro" de los compuestos de nueva síntesis frente a *T. cruzi* y *L. donovani*.**

Con el fin de evitar la dificultad de la utilización de un medio bifásico a la hora de proceder al estudio de la posible acción antiparasitaria de estos compuestos, se cultivaron los parásitos en medio MTL en el caso de *T. cruzi*, y en medio TC-199 en el caso de *L. donovani* (2.A.2.A.).

Después de tres pases en estos dos medios, utilizando siempre formas de los parásitos procedentes de los cultivos en fase exponencial de crecimiento, se recogieron de los frascos de cultivo y tras agitación se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos. Una vez centrifugados, se incubaron durante 12 horas a 28° C en un frasco de cultivo Steriling, sin retirarles tras esto el sobrenadante al objeto de que los flagelados más activos pasaran al mismo. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 3000 g durante 10 minutos; eliminando el sobrenadante de este último centrifugado, y adicionándole medio de cultivo nuevo. Se ajustó mediante recuento en cámara hemocitométrica de Neubauer, el número de parásitos a 10<sup>6</sup> por mililitro.

## 2.B.1. Compuestos ensayados.

### 2.B.1.A. Complejos de Rh(III).

Todos los complejos de Rh(III) ensayados, son complejos octaédricos y catiónicos.

#### .- Serie A:

Su estructura responde a la fórmula  $[\text{Rh}^{\text{III}} (\text{L})_4 (\text{Cl})_2]^+ \text{Cl}^-$ , en donde los ligandos (L) son medicamentos clásicos antiparasitarios, los cuales se enlazan al  $\text{Rh}^{\text{III}}$  a través de un átomo de N:⇒ mediante enlace coordinativo. A esta serie corresponden los siguientes complejos ensayados:

- Rh(III)-Benznidazole.
- Rh(III)-2-Cl-Benzothiazol.
- Rh(III)-Amodiaquine.
- Rh(III)-Ketodipiridile.
- Rh(III)-Niridazole.
- Rh(III)-2-2'-Diquinoleina.
- Rh(III)-Mepacrine.
- Rh(III)-Primaquine.
- Rh(III)-1,4-DAP.

#### .-Serie B:

Su estructura responde a la fórmula  $[\text{Rh}^{\text{III}} (\text{L})_4 (\text{Br})_2]^+ \text{Br}^-$ , siendo (L) los ligandos. A esta serie pertenecen los siguientes complejos ensayados:

- Rh(III)-Oxamniquine-Br.
- Rh(III)-Mepacrine-Br.
- Rh(III)-Praziquantel-Br.
- Rh(III)-Amodiaquine-Br.

#### .-Serie C:

Su estructura corresponde a la fórmula  $[\text{Rh}^{\text{III}} (\text{L})_3]^0$ , siendo (L) un ligando aniónico bidentado derivado de alquil o acil ditiocarbamato o bien de acil o alquil xantato. A esta serie pertenecen los dos compuestos siguientes:

- Rh(III)-Etilxantato.
- Rh(III)-Hexilxantato.

**2.B.1.B. Complejos de Rh(I).**

Son compuestos de fórmula general  $[\text{Rh}^{\text{I}} \text{Br}_2]^0$ .

**.-Serie D:**

A esta serie pertenecen los dos compuestos siguientes ensayados:

-Rh(I)-COD-5,7-Dibromoxine.

-Rh(I)-COD-Mepacrine.

Siendo COD las siglas del 1,5 Ciclooctadieno.

**2.B.1.C. Complejos de Ir(I).**

Son compuestos de fórmula general  $[\text{Ir}_2^{\text{I}}]^{2+} 2 \text{X}^-$ ; siendo  $\text{X}^-$  el monoanión correspondiente en cada caso. Son complejos organometálicos dinucleares y dicatiónicos. Algunos de ellos llevan el ligando diolefínico 1,5 ciclooctadieno ( $\text{C}_8 \text{H}_{12}$ ), que se ha indicado con las siglas COD.

**.-Serie E:**

A esta serie pertenecen los siguientes compuestos:

-Ir(I)-COD-Pyrolidinditiocarbamato.

-Ir(I)-COD-5,7-Dibromoxine.

-Ir(I)-Pentamidine-Benzylorange.

-Ir(I)-COD-Primaquine-Ethylfumarato.

-Ir(I)-COD-5,7-Dibromoxine.

-Ir(I)-COD-n-heptylthiocarboxylato.

-Ir(I)-COD-Pentamidine-Methylorange.

**2.B.1.D. Complejos de Ir(III).**

Su estructura general es  $[\text{Ir}^{\text{III}} (\text{L})_4 (\text{X})_2]^+ \text{X}^-$ ; siendo  $\text{X} = \text{Cl}^-$  o  $\text{Br}^-$ , y L diferentes medicamentos clásicos, orgánicos, antimaláricos, antilepra etc. Se trata de complejos octaédricos y catiónicos, en donde los ligandos enlazan con el Ir(III) a través de un átomo N:→ que da enlace coordinativo.

**.- Serie F:**

A esta serie pertenecen los siguientes compuestos ensayados:

- Ir(III)-Isobutilxantato.
- Ir(III)-4-Carboxypirolidinditiocarbamato.
- Ir(III)-2 Amino 4,5 Dimetiliazoldtc.
- Ir(III)-Mepacrine.
- Ir(III)-Benznidazole.
- Ir(III)-Primaquine.
- Ir(III)-2-Amino-4-ClBenznidazolditiocarbamato.
- Ir(III)-Pyrolidincarboxylate.
- Ir(III)-Ethylxantato.
- Ir(III)-Mefloquine.
- Ir(III)-Amodiaquine.
- Ir(III)-Lepidine.

**2.B.1.E.- Complejos de Ir(IV).**

Se trata de sales complejas del anión  $[\text{Ir}^{\text{IV}} \text{Cl}_6]^{2-}$  de estructura general  $[\text{Ir}^{\text{IV}} \text{Cl}_6] (\text{LH}_2)$ , en donde  $\text{LH}^{2+}$  es la estilbamidina diprotonada ó LH el Benznidazole monoprotonado (RO).

**.- Serie G:**

A esta serie pertenecen los dos siguientes complejos ensayados:

- Ir(IV)-Cl-Stilbamidina.
- Ir(IV)-RO.

**2.B.1.F.- Complejos de Pt(II).**

Son complejos de estructura general Cis-Pt<sup>II</sup> (L) (Cl)<sub>2</sub>, siendo (L) el ligando. Se trata de complejos cuadrado-planos de simetría molecular "cis", en donde un átomo de N del ligando (L) está enlazado por un enlace coordinativo con el Pt(II). Se trata de un complejo neutro del Pt(II).

**.- Serie H:**

A esta serie pertenecen los siguientes complejos ensayados:

- Pt(II)-Berenile.
- Pt(II)-Br-RO.
- Pt(II)-Phemolrot.
- Pt(II)-Oxamniquina.
- Pt(II)-DAP-SSHS.

### 2.B.1.G. Complejos del Pt(IV).

Son sales complejas de fórmula general  $[\text{Pt}^{\text{IV}} \text{Br}_6]^{2-} (\text{LH}^+)_2$ , en donde  $\text{LH}^+$  es el ligando monoprotonado.

#### .- Serie I:

A esta serie pertenecen los tres complejos siguientes ensayados:

- Pt(IV)-Br-Berenile.
- Pt(IV)-Br-RO.
- Pt(IV)-Br-Metamidium.

### 2.B.1.H. Complejos de Ru(III).

Son complejos de estructura general  $[\text{Ru}^{\text{III}} \text{Cl}_4 (\text{L})_2]^{-} (\text{LH}^+)$ ; es decir que contienen un complejo aniónico y octaédrico del Ru (III) y un ligando monoprotonado que hace el balance de carga. Todos los ligandos (L) se unen al Ru(III) a través de un enlace dador N: $\Rightarrow$  (enlace coordinativo).

#### .- Serie J:

A esta serie pertenecen los siguientes complejos ensayados:

- Ru(III)-Benzimidazol.
- Ru(III)-4-Nitrotiazol.
- Ru(III)-Ketoconazole.
- Ru(III)-Berenile.
- Ru(III)-Benzotiazol.
- Ru(III)-Ciclohexyl-Thiocarboxilate.
- Ru(III)-2-Amino-Benzothiazol.
- Ru(III)-Primaquine.
- Ru(III)-Thiazol.
- Ru(III)-2,4-Dinitrotiazol.
- Ru(III)-4-Nitroimidazol.
- Ru(III)-Imidazol.



**2.B.1.I. Complejos del Os (III).**

Son complejos neutros y octaédricos del Os(III) de estructura general  $[\text{Os}^{\text{III}} (\text{L})_3]^0$ , siendo (L) el ligando aniónico bidentado derivado del alquil o acil ditiocarbamato o bien del acil o alquil xantato.

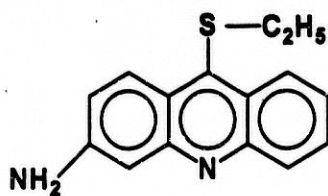
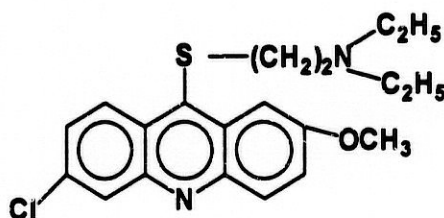
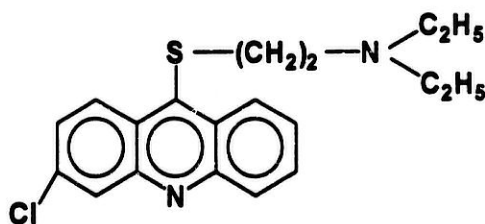
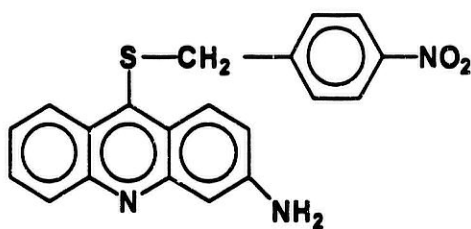
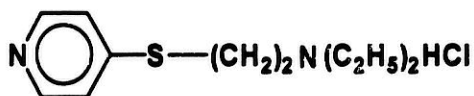
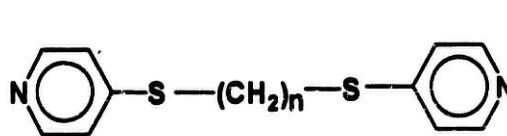
**.- Serie K:**

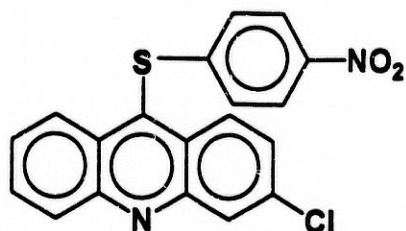
A esta serie pertenecen los siguientes complejos del Os(III) ensayados:

- Os(III)-2,4-Dinitroimidazolditiocarbamato.
- Os(III)-2-Nitroimidazolditiocarbamato.
- Os(III)-Piperazin.
- Os(III)-Morfolinditiocarbamato.
- Os(III)-2-Hidroxiethylpirolidinditiocarbamato.
- Os(III)-Anilinditiocarbamato.
- Os(III)-2-Amino-6-BrBenzotiazolditiocarbamato.
- Os(III)-5-Carboxypyrolidinditiocarbamato.
- Os(III)-2,5-Dimetil-Anilinditiocarbamato.
- Os(III)-4-Nitroimidazol.
- Os(III)-Benzimidazolditiocarbamato.

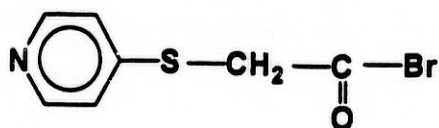
## 2.B.1.J. Derivados Acridínicos.

Se ensayó la acción de 15 derivados acridínicos tanto frente a las formas epimastigotes de *T. cruzi* como frente a formas promastigotes de *L. donovani*. La estructura y nombre dado a estos compuestos son los siguiente:

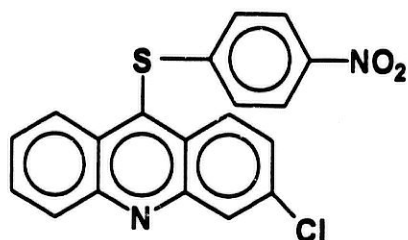
**BG-203****BG-237****BG-289****BG-314****BG-405**n=2 **BG-444**n=8 **BG-451**



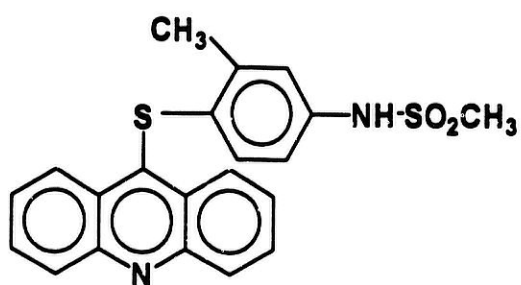
**BG-460**



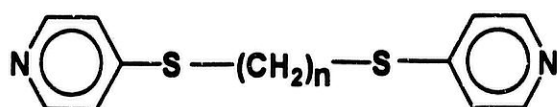
**BG-481**



**BG-493**



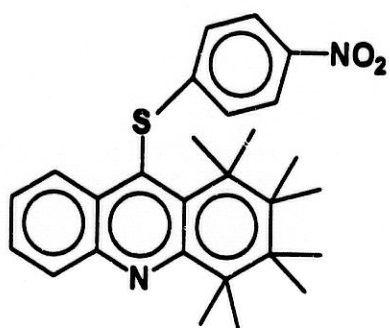
**BG-498**



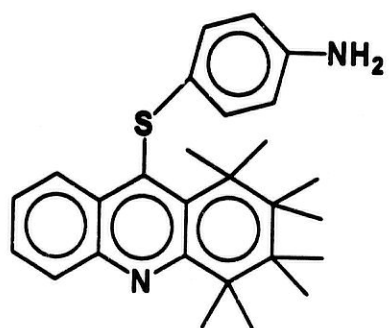
n=1 **BG-506**

n=4 **BG-514**

n=6 **BG-515**



**BG-529**



**BG-530**

## 2.B.2. Ensayo de los compuestos.

### Disolución de los compuestos.

Como disolvente de los diferentes compuestos utilizados, se utilizó Dimetilsulfóxido (DMSO), a la concentración final en el medio de cultivo de 0.1% (v/v).

La solución madre para las posteriores diluciones de los compuestos, fue de 2 mg/ml.

### 2.B.2.A. Tratamiento "in vitro" con los compuestos de las diferentes formas de *T. cruzi* y *L. donovani*.

Para la realización de estas experiencias se utilizaron concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$ . Aquellos compuestos que mostraron actividad elevada a 1  $\mu\text{g/ml}$  fueron ensayados a las concentraciones de 0.1, 0.01 y 0.001  $\mu\text{g/ml}$ . Para cada concentración se efectuaron tres réplicas, con un control con la máxima concentración de disolvente para cada réplica, con objeto de comprobar que la concentración de DMSO empleada no alteraba el crecimiento y movilidad de los parásitos.

Los ensayos se realizaron en cultivos de epimastigotes, amastigotes y trypomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* y en cultivos de amastigotes y promastigotes de *L. donovani*, utilizando como soporte placas de microtitulación de fondo plano (NUNC), mantenidas durante 24, 48 y 72 h a 28° C, en atmósfera húmeda enriquecida un 5% con CO<sub>2</sub>.

Con el fin de evaluar comparativamente la inhibición del crecimiento que ejerce cada una de las diferentes dosis de los productos ensayados, en los diferentes periodos de tiempo, se procedió al cálculo de los porcentajes de inhibición del crecimiento en relación al número de flagelados existentes en los controles, para lo cual se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%I.C. = \frac{T_c - T_p}{T_c} \times 100; \quad \text{siendo:}$$

-%I.C = Porcentaje de inhibición del crecimiento para cada periodo de tiempo y para cada dosis del producto ensayado.

-T<sub>c</sub>= Número de parásitos por ml existentes en los pocillos control.

-T<sub>p</sub>= Número medio de parásitos por ml correspondiente a los diferentes productos ensayados y sus respectivas dosis.

### **2.B.2.B. Ensayos de citotoxicidad.**

Los ensayos de citotoxicidad se han realizado frente a células HeLa y Vero, y macrófagos RAW 264.7 y J-774A.1. Para determinar la viabilidad celular se utilizó la tinción con el colorante vital Azul Tripán.

#### **2.B.2.B.1. Siembra de células en placas de microtitulación.**

Partiendo de cultivos celulares en monocapa, se procedió a la separación de estas células de su soporte mediante solución EDTA-Trypsina (Díaz, 1993), pasándose a frascos de fondo cónico de 25 ml de capacidad (STERILING). Seguidamente, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, retirándose el medio de cultivo y adicionándose solución de Hank hasta tener una concentración final de  $10^6$  células /ml.

Utilizando una micropipeta, se distribuyó esta suspensión celular a razón de 100  $\mu$ l por cada pocillo, pasándose a un incubador automático con atmósfera húmeda y enriquecida con el 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas. Posteriormente, se retiró el medio de mantenimiento y se adicionó el medio fresco correspondiente (2.A.7.) con el producto cuyo efecto pretendíamos conocer a la concentración determinada previamente en función de su efectividad sobre las formas del parásito.

#### **2.B.2.B.2. Tinción de células con Azul Trypan.**

Transcurrido el tiempo previsto para el desarrollo de la experiencia en cuestión, se procedió a teñir las células con una solución de azul-trypan (SIGMA) al 0.1% (P/V) en PBS, previamente filtrado por membranas de filtración (Sartorius) de un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m.

Se cuantificó el número de células teñidas y se calculó la relación de éstas con arreglo a un control de células cuyo medio no contenía los compuestos seleccionados.

#### **2.B.2.B.3. Tinción de las células infectadas.**

Las células fueron teñidas con Giemsa al 10% en tampón fosfato (pH:7.2). Una vez completamente seca la tinción, se recubre toda la preparación con D.P.X. y se monta en portas desengrasados. Antes de observar las preparaciones y con la finalidad de que estas no se estropeen, es necesario que el medio de montaje endurezca.

**2.B.2.B.4. Tratamiento de células HeLa y macrófagos J-774A.1 parasitados con los diferentes compuestos estudiados.**

Las células HeLa y los macrófagos J-774 infectados con formas metacíclicas de *T. cruzi* y promastigotas de *L. donovani* tal y como anteriormente se detalló (2.A.9.), se pusieron en contacto durante 24, 48 y 72 horas con los compuestos utilizando en todos los casos concentraciones inferiores a las mostradas como citotóxicas para las líneas celulares estudiadas.

Para cada concentración se dispuso de tres lotes con tres microreceptáculos para cada lote, repitiéndose la experiencia 4 veces. Para cada réplica se empleó un lote control conteniendo células y macrófagos infectados y en el medio de cultivo la concentración máxima de disolvente empleado.

Las placas de microtitulación conteniendo las células parasitadas se incubaron a 37° C en una atmósfera enriquecida con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, se retiró el medio y se procedió a lavar los soportes celulares con solución de Hank, y a fijarlos con metanol durante 30 segundos estudiándose bajo microscopía el número de amastigotes intracelulares y la proporción de células infectadas en cada cultivo tratado.

**2.B.2.B.5. Tratamiento con los compuestos estudiados de las formas promastigotas de *L. donovani* y metacíclicas de *T. cruzi*, antes de la infección.**

Ambas formas del ciclo de vida de ambos parásitos, fueron pretratadas con los compuestos seleccionados durante dos horas. Las dosis ensayadas fueron 100, 10 y 1 µg/ml; y tras el pretratamiento se procedió a la infección de macrófagos J-774A.1 en el caso de *L. donovani*, y de células HeLa en el caso de *T. cruzi*, siguiendo el procedimiento indicado con anterioridad (2.A.9.). El efecto que ejercían los compuestos seleccionados en la capacidad de interiorización de los parásitos se determinó siguiendo el procedimiento indicado en el apartado anterior (2.B.2.B.4.).

**2.B.2.B.6. Tratamiento con los compuestos estudiados de los macrófagos J-774A.1 y de las células HeLa, anteriormente a la infección por *L. donovani* y *T. cruzi* respectivamente.**

Tanto los macrófagos J-774A.1 como las células HeLa, fueron pretratados durante dos horas con dosis de los compuestos que no mostraban citotoxicidad en este intervalo de tiempo. A continuación se procedió a la infección con formas promastigotas de *L. donovani* de los macrófagos J-774A.1, y con formas metacíclicas de *T. cruzi* las células HeLa (siguiendo lo indicado en el apartado 2.A.9.). La acción que estos compuestos ejercían sobre la capacidad de interiorización de los parásitos se determinó tal y como se indicó en el apartado 2.B.2.B.4.

**2.B.2.B.7. Estudio de la acción de los compuestos sobre los niveles de incorporación de Timidina [<sup>3</sup>H], Uridina [<sup>3</sup>H] y Leucina [<sup>3</sup>H].**

Para estos estudios se tomaron cultivos de formas promastigotas de *L. donovani* y epimastigotas de *T. cruzi* en fase exponencial de crecimiento. El número de parásitos fué en todos los casos de  $1 \times 10^6$  por mililitro. El volumen total de estos cultivos se dividió en tres lotes a los que se les adicionó respectivamente  $5 \mu\text{Ci}$  de Timidina-6-<sup>3</sup>H (actividad específica 26-30 Ci/mmol); Uridina-5-<sup>3</sup>H (actividad específica 25-30 Ci/mmol) y Leucina-4.5-<sup>3</sup>H (actividad específica 35-70 Ci/mmol) por ml de medio de cultivo. Todos estos radiotrazadores fueron suministrados por Radiochemical Center U.K.

El tiempo de incubación con los isótopos radioactivos, fue de 15 minutos a 28° C, transcurridos los cuales, cada lote se dividió en tres, utilizando uno como lote control, al que solo se le añadió la concentración máxima de disolvente (DMSO al 0.1% v/v) y los otros dos como lotes problema, a los que se adicionaron respectivamente 50 y 100  $\mu\text{g}$  de producto ensayado por ml de medio de cultivo. Todos los lotes se incubaron a 28° C durante 135 minutos, al cabo de los cuales se tomaron las alícuotas de cada cultivo en intervalos de 45 minutos, a partir de la adición del producto.

Las muestras se tomaron con una micropipeta automática y lavadas repetidas veces con PBS mediante centrifugación a 7000 g durante 3 minutos en una microfuga (Beckman), adicionando en el último lavado PBS-Albúmina (Mesa Valle, 1991), a una concentración final de 0.3 mg/ml. Tras una agitación leve se agregó ácido tricloroacético (TCA) al 10% V/V, a fin de precipitar las proteínas del parásito, incubando seguidamente durante 2 horas a 4° C. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras tratadas se filtraron en un equipo de filtración múltiple Millipore, a través de filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio. A continuación, los filtros se lavaron haciéndoles pasar 10 ml de TCA al 5% v/v frío.



Una vez lavados, los filtros se secaron mediante una lámpara de infrarrojos durante 15 minutos, facilitando de esta manera la evaporación del TCA.

Una vez secados los filtros se introdujeron en viales de centelleo, con 4 ml de líquido de centelleo (Byefeld y col., 1966). Tras una agitación durante 30 segundos de cada uno de los tubos, se midieron en un contador de centelleo líquido para partículas Beta, (Beckman, Palo Alto, CA, USA).

### 2.C. Ensayos bioquímicos.

Se partió de alicuotas de 3 ml de cultivos de formas promastigotas de *L. donovani* y de formas epimastigotas de *T. cruzi*, ambas en fase de crecimiento exponencial y con una concentración celular de  $1 \times 10^6$  flagelados/ml.

Los compuestos fueron añadidos a los cultivos a la dosis de  $0.5 \mu\text{g/ml}$  (con excepción de los cultivos que sirvieron de controles y a los que no se les añadieron los compuestos a ensayar), incubándose durante 48 h a  $28^\circ \text{C}$  (en atmósfera húmeda y con un 5% de  $\text{CO}_2$ ).

Después de este tiempo las alicuotas de 3 ml procedentes de estos cultivos fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos (en centrífuga ALC 1224), recolectándose los sobrenadantes para su análisis mediante espectroscopía [ $^1\text{H}$ ] RMN y métodos enzimáticos, estudiándose cualitativa y cuantitativamente los metabolitos producidos por los parásitos. También se sometió a estudios de [ $^1\text{H}$ ] Resonancia Magnética Nuclear (RMN) a los medios de cultivo de formas amastigotas de ambos parásitos obtenidas "in vitro" siguiendo el procedimiento ya descrito (2.A.2.C. y 2.A.2.D.). A los sobrenadantes de estos cultivos se les determinó el pH en un pHmetro (CRISON) microPH-2001.

El botón obtenido de la centrifugación indicada anteriormente y libre de medio fue homogeneizado en ultraturrax, en tampón sacarosa 0.25 M, pH 7.4, utilizándose para los ensayos enzimáticos.

### **2.C.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear [<sup>1</sup>H].**

Los espectros de RMN [<sup>1</sup>H] fueron obtenidos mediante un aparato Bruker AM-300 operando a 300,13 MHz en protones, y manteniéndose la temperatura a 27° C. Se utilizaron pulsos técnicos y transformada de Fourier, con 90° de pulso y un espectro de 3287.5 Hz.

Se utilizó presaturación para eliminar el H<sub>2</sub>O, irradiando a la frecuencia del agua durante 2,5 s y a intervalos de pulso de 7,5 s; acumulando 160 FIDs y multiplicando el total exponencialmente con un acumulado de 0.2 después de aplicar la transformada. Los resultados se expresan en partes por millón (ppm).

### **2.C.2. Identificación de los metabolitos.**

Las resonancias de los metabolitos fueron determinadas por adición de los compuestos puros y realizando análisis comparativo. Las curvas fueron construidas por adición de los compuestos a los medios de cultivo, siendo lineal en un rango de 0-20 mM. Todos los coeficientes de correlación fueron mayores a 0.98. La cuantificación de los metabolitos fue ensayada bioquímicamente como describe Bergmeyer (1988).

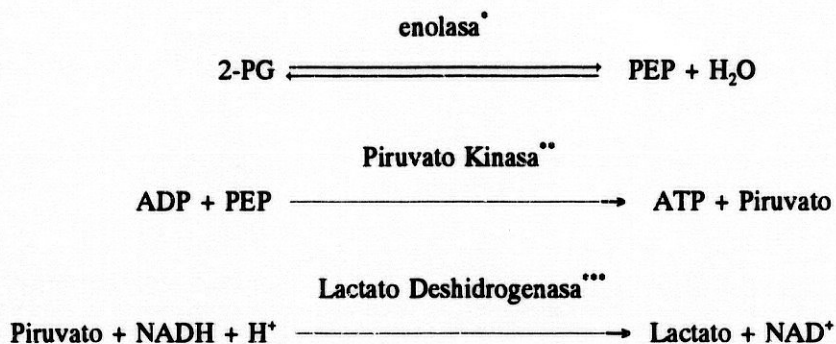
#### **2.C.2.A. Determinación de metabolitos.**

Se realizaron determinaciones de Piruvato, Acetato, Succinato, Etanol y Lactato; a partir de homogeneizados de los parásitos obtenidos tal y como se indicó con anterioridad.

### 2.C.2.A.1. Determinación de Piruvato.

Se siguió la técnica descrita por Bergmeyer (1988).

#### Principio:



\* 2-Phospho-D-glycerfate hidro-lyase, EC 4.2.1.11.

\*\* ATP: pyruvate 2-O-phosphotransferase, EC 2.7.1.40.

\*\*\* L-Lactate: NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.27.

#### Reactivos:

-Tampón Trietanolamina (0.5 M; pH 7.6; 5 mM EDTA):

Se disuelven 23.3 g de trietanolamina hidroclorehidrica en 200 ml de agua destilada, y se añaden 0.47 g de EDTA-Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, ajustando el pH a 7.6 con solución 2 N de NaOH (20 ml) y diluida a 250 ml con agua destilada.

-NADH 6 mM:

Se disuelven 10 mg de NADH-Na<sub>2</sub> en 2 ml de agua destilada.

-Lactato deshidrogenasa, LDH (0.5 mg protein/ml):

#### Procedimiento:

Tras mezclar 400  $\mu$ l de muestra, 600  $\mu$ l de tampón trietanolamina y 20  $\mu$ l de NADH, se lee la absorbancia a una longitud de onda de 360 nm, a los 5, 10 y 15 minutos. (E<sub>1</sub>)

Se añaden 10  $\mu$ l de LDH, y se lee a la misma a la misma longitud de onda(360 nm), a los 15, 20 y 25 minutos. ( $E_2$ )

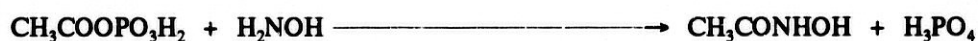
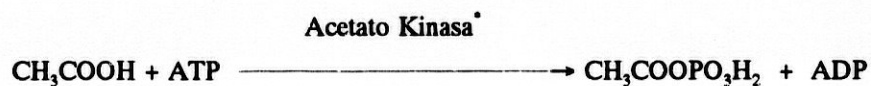
**Cálculo:**

$$E_1 - E_2 = E$$

$$\text{Resultado} = 0.39 \times E \times 1/\text{Vol } \mu\text{mol/ml.}$$

**2.C.2.A.2. Determinación de Acetato.**

**Principio:**



\* Acetato Kinasa (ATP: acetato fosfotransferasa, EC 2.7.2.1).

**Reactivos:**

-Solución "standard" de acetato (10 mM):

Se disuelven 136 mg de acetato sódico 3  $\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada y se lleva a 100 ml.

-Tampón (0.1 M; pH 7.4):

Se disuelven 1.85 g de trietanolamina hidroclicorhidrica y 0.4g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 80 ml de agua destilada, y se ajusta el pH a 7.4 con NaOH 4 N diluido en 100 ml de agua destilada.

-ATP (84 mM):

Se disuelve 1 g de  $\text{ATP-Na}_2\text{H}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  en 20 ml de solución al 5% de  $\text{NaHCO}_3$ .

-Hydroxilamina (4 M):

Se disuelven 14 g de hydroxilamina en 50 ml de agua destilada. Justamente antes de usar se neutraliza con igual volúmen de NaOH 4 N.

## MATERIAL Y METODOS

---

-Acido Tricloroacético (0.6 M):

Se disuelven 2 g de ácido tricloroacético en 20 ml de agua destilada.

-Cloruro Férrico (60 mM):

Se disuelven 1.66 g de cloruro férrico en 10 mililitros de HCl, y se diluye con agua destilada hasta 100 ml.

-Acido Perclórico (5.8 N):

Se diluyen 50 ml de ácido perclorico con 50 ml de agua destilada fria.

-Acetato kinasa (5 mg protein./ml):

Es necesario diluir la suspensión stock en solución 3.2 M de sulfato amónico.

### Procedimiento:

Tras mezclar 0.50 ml de tampón, 0.20 ml de ATP, 0.20 ml de solución de Hydroxilamina neutralizada, 20  $\mu$ l de Acetatoquinasa (AK) y 100  $\mu$ l de muestra en el standard de la solución de acetato, se incuba durante 30 minutos.

Se agrega 1 ml de ácido tricloroacético y 4 ml de solución de FeCl<sub>3</sub>, centrifugándose a continuación a 12000 rpm (microfuga BECKMAN), y se recoge el sobrenadante. Se realiza la medida en un espectrofotómetro, leyendo a una longitud de onda de 492 nm, frente a un blanco con muestra pero sin AK.

### Cálculos:

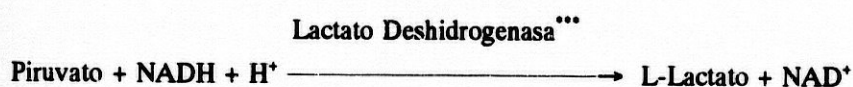
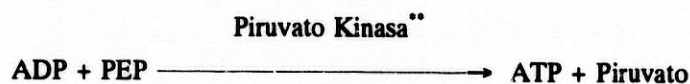
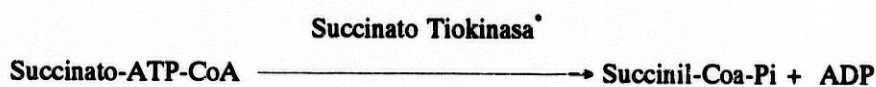
$E_1$  = coeficiente de extinción de la muestra.

$E_2$  = coeficiente de extinción standard.

$$c = \frac{E_1 \times 1/\text{vol}}{E_2} \mu\text{mol/ml} \times 60 = \text{resultado mg/ml}$$

## 2.C.2.A.3. Determinación de Succinato.

## Principio:



\* Succinato tiokinasa, STK (Succinato: CoA ligasa, ADP-forming, EC 6.2.1.5).

\*\*Piruvato kinasa, PK (ATP: piruvato 2-O-Fosfotransferasa, EC 2.7.1.40).

\*\*\*Lactato deshidrogenasa, LDH (L-Lactato: NAD oxidoreductasa, EC 1.1.1.27).

## Reactivos:

-Tampón trietanolamina MgCl<sub>2</sub> EDTA (50 mM de trietanolamina; 10 mM de MgCl<sub>2</sub>; 5 mM de EDTA; pH 7,4):

Se disuelven 9.3 g de triethanolamine hydrochloride, 2.0 g de MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O y 1.9 g de EDTA-Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O en agua, ajustando el pH a 7.4 con KOH 1 N, y llevando a 1000 ml con agua destilada.

-NADH (2.4 mM):

Se disuelven 4 mg de NADH-Na<sub>2</sub> en 2 ml de tampón trietanolamina a pH 8.2 [este se obtiene de mezclar trietanolamina 0.2 M con HK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.3 M (1 g de trietanolamina y 8 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 25 ml de agua, y a pH 8.2)].

-Mezcla coenzimática (5mM de CoA; 10 mM de ATP; 50 mM de PEP): Se disuelven 8 mg de Coa; 12 mg de ATP y 50 mg de PEP en 2 ml de agua, y se ajusta el pH a 6.0.

-Lactato deshidrogenasa/piruvato kinasa (1 mg/ml de cada una).

-Succinato tiokinasa (0.6 mg/ml; aproximadamente 21 U/ml).

## MATERIAL Y METODOS

---

### Procedimiento:

Se mezclan 840  $\mu$ l de tampón trietanolamina, 25  $\mu$ l de mezcla coenzimática, 25  $\mu$ l de NADH y 5  $\mu$ l de LDH/PK; se leyó en un espectrofotómetro frente a agua, a una longitud de onda de 340 nm. De este modo obtenemos el valor  $E_1$ .

Se agregan a continuación 5  $\mu$ l y se lee bajo las mismas condiciones anteriores, obteniéndose el valor  $E_2$ .

### Calculos:

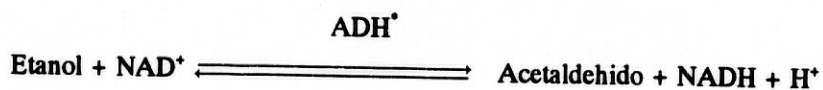
$$E_1 - E_2 = E_{\text{muestra}}$$

$$\text{Emuestra} - \text{blanco} = E$$

$$E \times 179.8 \times 1/\text{vol} = \text{Concentración } \mu\text{g/ml.}$$

### 2.C.2.A.4. Determinación de Etanol.

#### Principio:



\*ADH, Alcohol Deshidrogenasa, Alcohol: NADP(P) oxidoreductase, EC 1.1.1.2

#### Reactivos:

-Tampón (75 mM tampón pirofosfato, pH 8.7; 75 mM semicarbazida; 21 mM de glicina):

Se disuelven en 250 ml de agua destilada 10 g de  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  + 2.5 g de semicarbazida-HCl + 0.5 g de glicina; ajustándose el pH a 8.7 con 5 ml de KOH 4N, y se lleva a 300 ml con agua destilada.

-NAD (24 mM):

Se disuelven 50 mg en 1 ml de agua destilada.

-Alcohol deshidrogenasa, ADH (30 mg de proteina/ml).

**Procedimiento:**

Se mezclan 860  $\mu$ l de tampón, 30  $\mu$ l de NAD, 100  $\mu$ l de muestra, y se lee frente al blanco a 340 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Spectronic 3000 Array (MILTON ROY) ( $E_1$ ). Para el blanco se utiliza agua hasta 1 ml.

Se agregan 8  $\mu$ l de ADH, se mezclan y se incuba a 37° C durante 70 minutos. A continuación se lee en el espectrofotómetro bajo las mismas condiciones anteriores ( $E_2$ ).

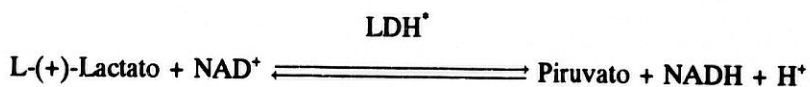
**Calculos:**

$$E = E_2 - E_1$$

$$E \times 122.9 \times 1/\text{vol} = \text{concentración } \mu\text{g/ml.}$$

**2.C.2.A.6. Determinación de L-(+)-Lactato.**

**Principio:**



\*LDH, Lactato Deshidrogenasa, L-Lactato: NAD oxidoreductasa, EC 1.1.1.27.

**Reactivos:**

-Tampón hidrazina/glicina (0.4 M hidrazina; 0.5 M de glicina; pH 9.0): Se disuelven 11.4 g de glicina y 25 ml de hidrato de hidrazina en 200 ml de agua, pH 9.0, llevándose con agua a 300 ml.

-NAD (40 mM): Se disuelven 150 mg de NAD en 5 ml de agua.

-Acido Perciórico (1 N):

Se disuelven 12.8 ml de HClO<sub>3</sub> EN 150 ml de agua.



-Lactato deshidrogenasa, LDH (5 mg/ml).

**Procedimiento:**

Se mezclan 75  $\mu$ l de tampón, 60  $\mu$ l de NAD, 100  $\mu$ l de muestra y 60  $\mu$ l de ácido perclórico. Se lee frente al aire a 340 nm ( $E_1$ ). Se añaden a continuación 6  $\mu$ l de LDH, y se incuba a 37° C durante 30 minutos, leyéndose bajo las mismas condiciones anteriores ( $E_2$ ).

**Cálculos:**

$$E_s = E_2 - E_1$$

$E_B$  blanco sin muestra

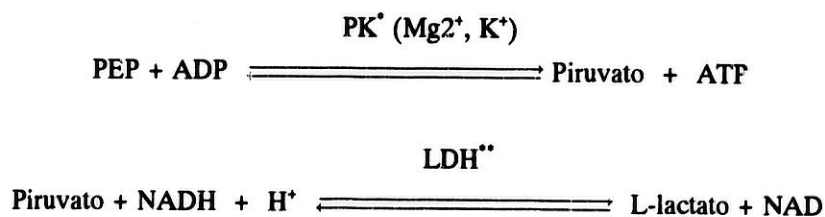
$$E = E_s - E_B$$

$$E \times 0.211 \times 1/\text{vol} = \text{concentración mg/ml.}$$

**2.C.3. Determinación de actividades enzimáticas.**

**2.C.3.A. Determinación de la actividad Piruvato Kinasa.**

**Principio:**



\*Piruvato Kinasa, PK, ATP: piruvato 2-O-Fosfotransferasa, EC 2.7.1.40

\*\*Lactato Deshidrogenasa, LDH, L-lactato: NAD oxidoreductasa, EC 1.1.1.27

**Reactivos:**

Todas las soluciones se realizan utilizando H<sub>2</sub>O purificada (MiliQ).

-Tampón Tris (1 mol/l; pH 8.0):

Se disuelven 12.1 g de Tris y 186 mg de EDTA-Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O en 75 ml de agua, ajustándose a pH 8.0 con HCl, llevándose a 100 ml con agua.

-MgCl<sub>2</sub> (100 mmol/l):

Se disuelven 2.033 g de MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O en 100 ml de agua.

-KCl (1 mol/l):

Se disuelven 7.456 g de KCl en 100 ml de agua.

-NADH (2 mmol/l):

Se disuelven 14.2 mg de NADH en 10 ml de solución NaHCO<sub>3</sub>.

-Lactato deshidrogenasa, LDH (60 kU/l).

-ADP (30 mmol/l):

Se disuelven 70.7 mg de ADP-Na<sub>2</sub> en 5 ml de agua, ajustándose a pH 7.0 con KOH, mol/l.

-Fosfoenolpiruvato (PEP) (50 mmol/l):

Se disuelven 103.1 mg de PEP-K en 10 ml de agua.

**Procedimiento:**

Se mezclan 100 µl de cada uno de los siguientes componentes: tampón, KCl, MgCl<sub>2</sub>, NADH y LDH; a esto se añaden 50 µl de ADP, 250 µl de agua y 100 µl de muestra. En el caso del blanco no se añade ADP, añadiéndose por tanto 300 µl de agua.

La mezcla anterior se incuba a 37° C durante 10 minutos.

A continuación se añaden 100 µl de PEP y se mide en un aparato Spectronic 3000 Array (MILTON ROY), a la longitud de onda de 540 nm.

### 2.C.3.B. Determinación de la actividad Succinato Deshidrogenasa.

Se ha determinado mediante el método espectrofotométrico de reducción que experimenta el ferricianuro potásico cuando el enzima realiza su cometido.

Se han ensayado cantidades variables de succinato y muestra, así como concentraciones diferentes de ferricianuro, a fin de encontrar la mezcla de reacción idónea. También se ajusta el pH óptimo de la enzima, dando un pH óptimo con tris-(hidroximetil)-aminometano pH 8.5.

La mezcla final de reacción está formada por:

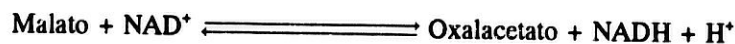
|  |          |
|--|----------|
| -Tris buffer pH 8.5.....                 | 0.75 ml. |
| -Ferricianuro K <sup>+</sup> 0.01 M..... | 0.10 ml. |
| -Succinato Na <sup>+</sup> 0.01 M.....   | 0.30 ml. |
| -Muestra.....                            | 0.10 ml. |
| -Agua destilada c.s.p.....               | 3.00 ml. |

La reacción es rápida y la lectura se llevó a cabo en un espectrofotómetro (BECKMAN) a 410 nm frente a un blanco de agua.

La actividad específica SDH se expresa en micromoles de sustrato consumido/mg de proteínas en un minuto. El sustrato consumido se calcula por extrapolación en una gráfica patrón de ferricianuro, teniendo presente que se van a reducir 2 moles de ferricianuro por cada mol de succínico que se oxide (Kmetec, 1966; Fortis y col., 1982).

### 2.C.3.C. Determinación de la actividad Malato Deshidrogenasa.

#### Principio:



#### Reactivos:

El agua utilizada está purificada en un aparato MiliQ.

- Tampón fosfato 0.1 mol/l, a pH 7.5.
- Acido oxalacético 2 mg/ml (en tampón fosfato).
- NADH (Sal sódica) (Boehringer Mannheim) (10 mg/ml) en tampón fosfato.

-Enzima malato-deshidrogenasa, 0.2 mmol/l, en tampón fosfato.

**Procedimiento:**

Sobre una cubeta de espectrofotómetro, se vierten 3 ml de tampón fosfato, a los que se añaden 100  $\mu$ l de la solución de oxalacetato, más 50  $\mu$ l de NADH. Finalmente, se añaden 20  $\mu$ l de enzima y se agita durante 30 segundos, midiéndose a 339 nm y a 25° C. Se realizan 60 ciclos de medida durante 15 minutos.

**2.D. Estudios a microscopía electrónica.**

**2.D.1. Microscopía electrónica de transmisión.**

Para observar las posibles alteraciones sufridas por los parásitos y células al ser tratados con los compuestos seleccionados, se procesaron muestras de los mismos en contacto con aquellas moléculas que habían mostrado elevada actividad "in vitro" y además no inducían alta citotoxicidad. Estos mismos compuestos fueron seleccionados para los posteriores ensayos "in vivo".

La concentración empleada frente a los parásitos fue de 10  $\mu$ g/ml y el tiempo de interacción varió entre 8 y 12 horas, dependiendo de la actividad demostrada.

Los efectos de los distintos compuestos seleccionados frente a células, se hicieron frente a células HeLa. Estas células fueron tratadas durante 6 h con una concentración de compuesto de 10  $\mu$ g/ml, disuelto en medio de cultivo MEM (10% SBFI). Al cabo de este tiempo, se les retiró el medio de cultivo, y se despegaron utilizando una espátula de goma (Robber Policeman). A continuación se continuó con el procedimiento de preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión.

Los compuestos utilizados fueron los siguientes:

- Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato.
- Ethylxantato de K<sup>+</sup>.
- BG-203.
- BG-237.
- BG-289.

El protocolo seguido para la microscopía electrónica de transmisión fue el siguiente:

La fijación de la muestra se lleva a cabo con glutaraldehído al 2.5 % en tampón cacodilato/CIH 0.1 M sacarosa 0.1 M, ajustándose el pH a 7.2, tal como recomiendan Brun y col. (1981).

Los parásitos se centrifugan y el botón resultante se resuspende en la solución de glutaraldehído, centrifugándose de nuevo. La muestra se mantiene en fijador a 4° C durante un mínimo de 12 horas y un máximo de 24 horas. Una vez fijados se sometieron a tres lavados con solución tamponada de Milloning (Mercer y Birbeck, 1979) a temperatura ambiente. Tras el lavado la muestra fue postfijada en solución de tetróxido de Osmio al 1% en PBS, a temperatura ambiente manteniéndose durante 30 minutos y sometiéndose a nuevos lavados en solución Milloning. Las muestras así tratadas fueron deshidratadas por la serie de alcoholes, desde alcohol de 70° hasta absoluto; procediéndose a la inclusión en resina Spurr a 60° C durante 12 horas.

Una vez incluida la muestra, se procedió al corte del bloque en ultramicrotomo "Ultratomo 8000" (LKB). Los cortes semifinos se tiñeron en azul de toluidina al 1% en solución de borax al 1%.

Escogida la zona, se realizaron en ella los cortes ultrafinos y se montaron en rejillas de cobre de 200 mesh. El corte ultrafino se contrastó, manteniéndose durante 30 minutos en acetato de uranilo al 8% y en citrato de plomo durante 5 minutos, siguiendo la técnica descrita por Reynolds en 1963.

Todas las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico ZEISS. Para la fotografía fueron empleadas placas KODAK (Electron Microscope Film 4489, Estar Thick Base).

## 2.E. Estudios "in vivo".

### 2.E.1. Pruebas "in vivo" frente a *L. donovani*.

#### 2.E.1.A. Inoculación de los compuestos a los animales parasitados por *L. donovani*.

Los animales empleados para estos ensayos fueron ratas Wistar de unos 50 g de peso. Para cada compuesto se utilizaron lotes de 8 ratas divididos en dos series de 4 animales cada uno. Uno de estos lotes se sometió a administración oral de los compuestos y a la otra serie a administración intraperitoneal. La pauta de administración fue de 4 dosis de administración diaria. Para cada uno de los compuestos se comparó con un lote control también de 4 ratas.

De los resultados obtenidos "in vitro", tanto de la actividad de los compuestos frente a los parásitos como frente a las diferentes líneas celulares, se obtuvieron mediante tratamiento informático (programa PHARM), las siguientes dosis de utilización "in vivo":

|                                    |                                |
|------------------------------------|--------------------------------|
| RhIII-Ethylxantato.....            | 0.302 $\mu\text{g/g}$ de peso. |
| Ethylxantato de $\text{K}^+$ ..... | 0.377 $\mu\text{g/g}$ de peso. |
| BG-203.....                        | 0.285 $\mu\text{g/g}$ de peso. |
| BG-237.....                        | 0.154 $\mu\text{g/g}$ de peso. |
| BG-289.....                        | .0261 $\mu\text{g/g}$ de peso. |

Los disolventes utilizados para la administración de los distintos compuestos fueron DMSO en el caso de los complejos metálicos, y aceite de oliva virgen en el caso de los derivados acridínicos. Para cada disolvente se utilizó también un lote de animales control al objeto de comprobar sus posibles efectos.

El método utilizado para el estudio de la actividad leishmanicida desarrollada por los compuestos seleccionados consistió en la evaluación comparativa del grado de afectación de los amastigotes esplénicos, a través de los parámetros que se citan a continuación.

Los animales son sacrificados a los 4 días de terminado el tratamiento, extrayéndose los bazos. En el momento de la extracción, los bazos son pesados y medidos (Segovia y col. 1984a).

### **2.E.1.B. Determinación de la proporción de amastigotes por células nucleadas normales de bazo.**

Tras pesar y medir los bazos, son seccionados transversalmente efectuándose una serie de improntas de los cortes. Tras el secado de los portas a temperatura ambiente, las preparaciones fueron fijadas con metanol y teñidas con solución de Giemsa al 10%, durante 15 minutos. Las preparaciones fueron estudiadas al microscopio óptico, contabilizándose la proporción de amastigotes en 500 células nucleadas normales de pulpa esplénica y el número de parásitos por célula parasitada.

### **2.E.1.C. Aislamiento de formas intracelulares.**

Para la obtención de las formas amastigotas de *L. donovani* (LCR-L133) albergadas en el interior de las células, los bazos son triturados y macerados en un potter a 4° C, en presencia de solución salina fisiológica (CINa 0.9%).

El homogenado resultante fué centrifugado en tubos estériles, a 1000 rpm durante 10 minutos, en una centrífuga ALC (Modelo 4226). Después de sucesivos lavados con solución tamponada (PBS) pH:7.2, los sedimentos derivados de la centrifugación, en condiciones idénticas a las anteriores, se trataron con tripsina (Difco 1:250) al 0.25% en PBS durante 5 minutos en agitación constante y a temperatura ambiente (Gamarro 1983). El tratamiento hace que las células estallen (Gamarro, 1983).

Tras el tratamiento con tripsina, las formas intracelulares obtenidas en suspensión son rápidamente bañadas en medio MEM conteniendo un 20% de SBFI, al objeto de que los factores inespecíficos que bloquean al enzima inactiven éste y no actúen sobre los parásitos.

#### **2.E.1.C.1. Purificación de las formas intracelulares.**

La purificación de los amastigotes de *L. donovani* (LCR-L133) procedentes de las células esplénicas y obtenidos por tratamiento enzimático, se efectúa por centrifugación en gradiente discontinuo de densidad de Percoll (Chang, 1980).

La preparación de estos gradientes se realiza partiendo de una solución stock de Percoll isotonizado con CINa 1.5 M. Dicha solución se prepara diluyendo 9 volúmenes de Percoll concentrado (densidad inicial 1.130 g/ml y osmolaridad 16 mOs/kg H<sub>2</sub>O), con 1 volumen de CINa 1.5 M,

presentando una densidad final de 1.123 g/ml.

Se utilizaron 5 gradientes de densidad (1.09, 1.08, 1.07, 1.06, 1.05 g/ml) de 1.5 ml de volúmen cada uno, obtenidos por adición de ClNa 0.15 M (densidad 1.0058 g/ml) a la solución stock de Percoll isotonzado, basándose en la siguiente expresión:

$$V_y = V_t \frac{dt - dx}{dy - dx}$$

Siendo:

- $V_y$  = Volúmen de la solución de Percoll isotonzado.
- $V_t$  = Volúmen total deseado.
- $dt$  = densidad final.
- $dx$  = densidad de ClNa 0.15 M.
- $dy$  = densidad de la solución de Percoll isotonzado.

Los gradientes preparados fueron teñidos alternativamente con azul de metileno, para una mejor diferenciación de las bandas.

Posteriormente al aislamiento, y una vez eliminado el sobrenadante resultante de una nueva centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos, las formas amastigotas son suspendidas en 4 ml de la solución de Percoll de mayor densidad (1.123 g/ml) y colocadas en el botón de un tubo de vidrio de 15 ml. Después de adicionar los gradientes en sentido ascendente de mayor a menor densidad, los tubos se centrifugaron en un rotor JS-13 en centrífuga refrigerada Beckman J2-21M.

#### 2.E.1.C.2. Determinación de la viabilidad de los amastigotes por captación de aminoácidos marcados.

La determinación de la viabilidad de los amastigotes aislados de bazo en los animales tratados, con respecto a los grupos control, se efectúa por evaluación del grado de captación e incorporación en material precipitable de Leucina- $^3\text{H}$ .

En este sentido, las suspensiones de amastigotes fueron centrifugadas a 1000 rpm en una centrífuga Micro Centaur (MSE) durante 3 minutos. Los sedimentos resultantes fueron tratados con 50  $\mu\text{l}$  de solución de Leucina- $^3\text{H}$  20  $\mu\text{Ci/ml}$  (con una actividad específica de 53 Ci/mmol)



(Dupont) en medio 199, e incubados a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>, siendo el tiempo estimado para la incorporación del aminoácido de 1 hora.

Una vez transcurrido el tiempo de marcaje, el aminoácido marcado, no captado por las formas amastigotas, fué eliminado mediante sucesivos lavados de las muestras con medio TC-199.

Antes de proceder a evaluar el grado de incorporación, las suspensiones de amastigotes fueron tratadas con 20 µl de solución de lauril sulfato sódico (SDS) al 0.1% y NaOH 0.1 N. Alicuotas de 2 µl se disgregaron a 4 ml de líquido de centelleo, efectuándose el contaje en un contador de partículas beta, Beckman (modelo LS-2800). Los resultados obtenidos, expresados en CPM y correspondientes a Leucina-[<sup>3</sup>H] incorporada, permitirán evaluar el efecto ejercido por el tratamiento experimental sobre la viabilidad de los amastigotes esplénicos.

## 2.E.2. Pruebas "in vivo" frente a *T. cruzi*

### 2.E.2.A. Inoculación de los compuestos a los animales parasitados por *T. cruzi*.

Para estos ensayos "in vivo" se utilizaron ratones machos, cepa Albino Swiss, de aproximadamente 20 g de peso medio. En cada experiencia se inocularon 10<sup>5</sup> tripomastigotes/ratón.

Los estudios "in vivo" realizados con animales parasitados por *T. cruzi* han sido el analisis de la efectividad de los compuestos de nueva síntesis sobre las formas sanguíneas de *T. cruzi*.

Para estos estudios "in vivo" se utilizaron lotes de 10 ratones infectados por producto estudiado, así como unos lotes control para el disolvente empleado y un lote de 10 ratones control parasitados. Una vez extraída la sangre de los ratones infectados, se mezcla con solución CPD (citrato-fosfato-dextrosa) [Acido cítrico 17mM; Citrato sódico 12 mM; Glucosa 12.8 mM; Fosfato bisódico 0.001 mM. Se mezcla una parte de C.P.D. con siete partes de sangre], realizándose lotes de sangre tal y como se indica a continuación:

- Lote 1: sangre control, con CPD.
- Lote 2: sangre, CPD y compuesto (10 veces la Dosis Efectiva).
- Lote 3: sangre, CPD y compuesto (Máxima Dosis Efectiva).
- Lote 4: sangre, CPD y compuesto (Dosis Efectiva).
- Lote 5: sangre, CPD y compuesto (mínima Dosis Efectiva).

-Lote 6: sangre, CPD y compuesto (Dosis Efectiva x 1/10).

-Lote 7: sangre, CPD y Violeta de Genciana.

(Cabe indicar que previamente se ensayaron las dosis de disolventes utilizadas para cada compuesto, no mostrando efectos sobre la sangre infectada).

Los lotes de sangre en C.P.D. se mantuvieron a 4° C. A los 4, 7, 14 y 21 días respectivamente. Se inyectó un ml de cada uno de dichos lotes en los animales, estudiándoseles la parasitemia por recuento en cámara hemocitométrica de Neubauer de la sangre extraída de la cola.

Antes del inóculo de la sangre tratada y no tratada fue observada microscópicamente al objeto de comprobar la morfología normal de los diferentes tipos de células sanguíneas.

**3.- RESULTADOS**

### 3.- RESULTADOS

#### 3.A.- Obtención "in vitro" de formas amastigotas de *L. donovani*.

Las formas amastigotas de *L. donovani* fueron obtenidas según se indica en el apartado 2.A.2.C.

La fotografía nº 1 muestra las formas promastigotas de *L. donovani* a los 3 días de cultivo a 28° C, mientras que la fotografía nº 2 muestra las formas amastigotas obtenidas "in vitro" a los 3 días de cultivo a 37° C. Las imágenes fueron obtenidas directamente de la observación con microscopio invertido.

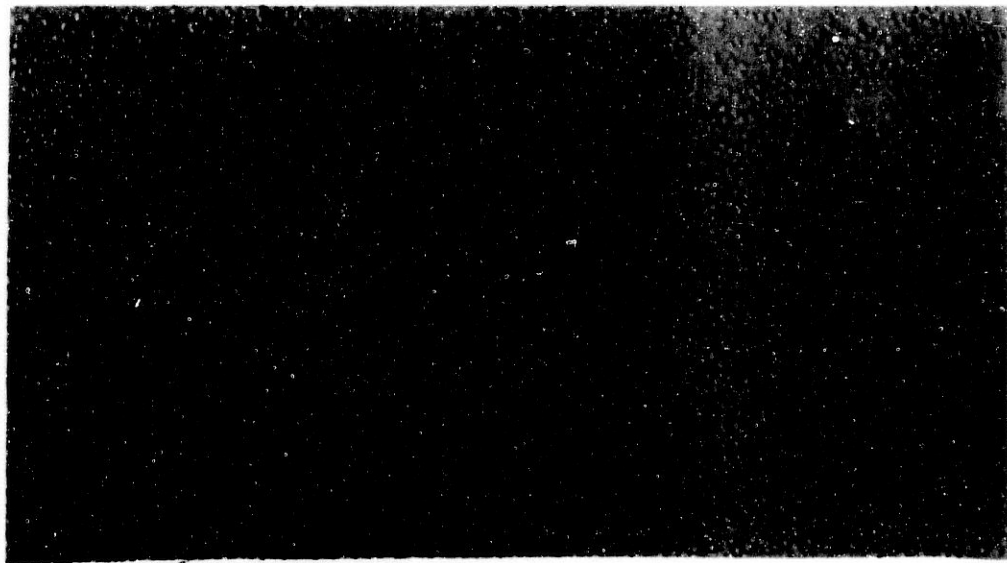
La fotografía nº 3 muestra una imagen de formas amastigotas de *L. donovani* obtenidas "in vitro" y teñidas con Giemsa. En ella se observan tanto formas en proceso de redondeamiento y pérdida del flagelo, como formas amastigotes.

La figura nº 1, muestra el crecimiento de *L. donovani* en el medio de cultivo TC-199 a las temperaturas de 28 y de 37° C, observándose la transformación que se produce de promastigotes a formas amastigotas. Así mismo se refleja el cambio de pH que se experimenta durante el proceso de transformación.

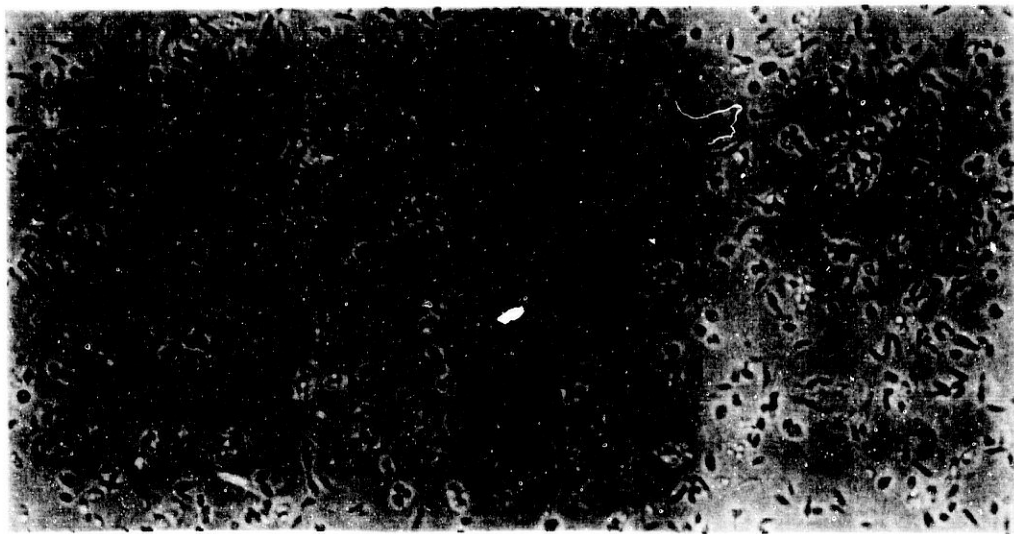
La figura nº 2, muestra la curva de crecimiento de las formas amastigotas de *L. donovani*, cultivadas a 37° C y habiéndose purificado previamente tal y como se indica en el apartado 2.A.3.



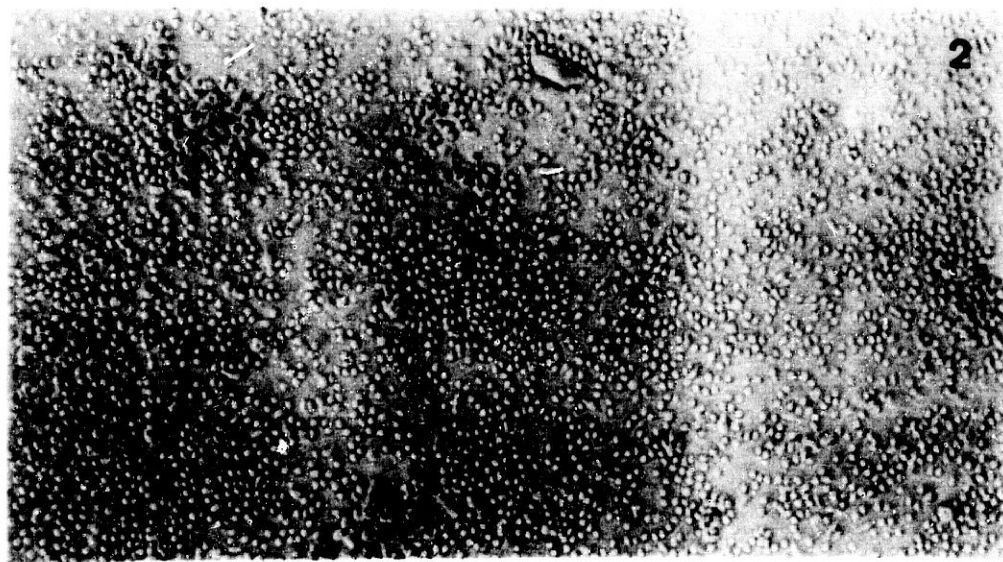
**Fotografía nº 1: formas promastigotes de *L. donovani* a los tres días de cultivo a 28° C.  
(200 X).**



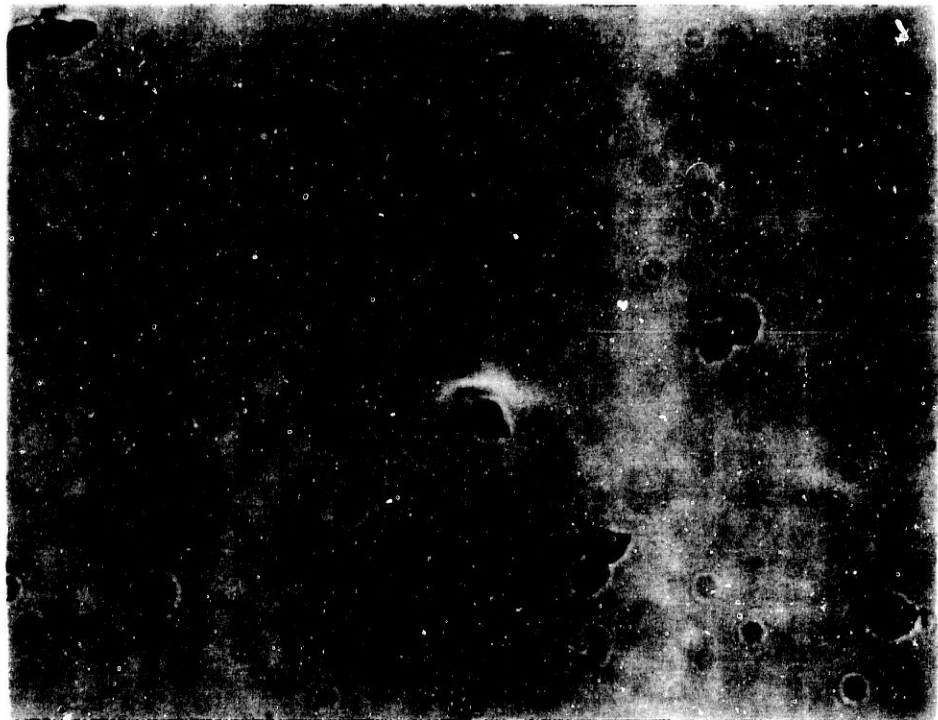
**Fotografía nº 2: formas amastigotes de *L. donovani* a los tres días de cultivo a 37° C.  
(200 X).**



Fotografía nº 1: formas promastigotes de *L. donovani* a los tres días de cultivo a 28° C.  
(200 X).



Fotografía nº 2: formas amastigotes de *L. donovani* a los tres días de cultivo a 37° C.  
(200 X).



Fotografía nº 3: observación a microscopía óptica (1000 X) de formas esferomastigotes (E) y amastigotes (A.) de *L. donovani* teñidas con Giemsa y obtenidas "in vitro" tras dos días de cultivo a 37° C.



**Fotografía nº 3: observación a microscopía óptica (1000 X) de formas esferomastigotes (E) y amastigotes (A) de *L. donovani* teñidas con Giemsa y obtenidas "in vitro" tras dos días de cultivo a 37° C.**



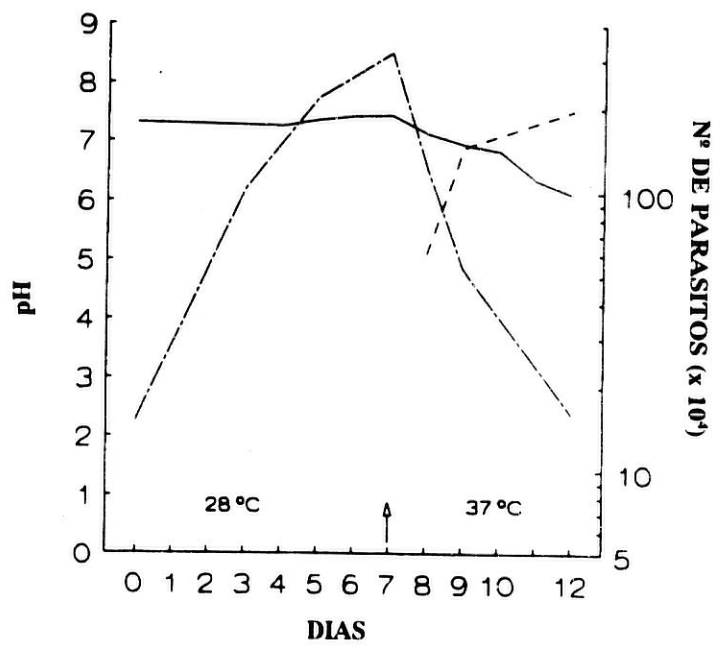


Figura nº 1: variación del pH y proceso de transformación en formas amastigotes de *L. donovani*. (— pH; - · - · - formas promastigotes; - - - formas amastigotes).

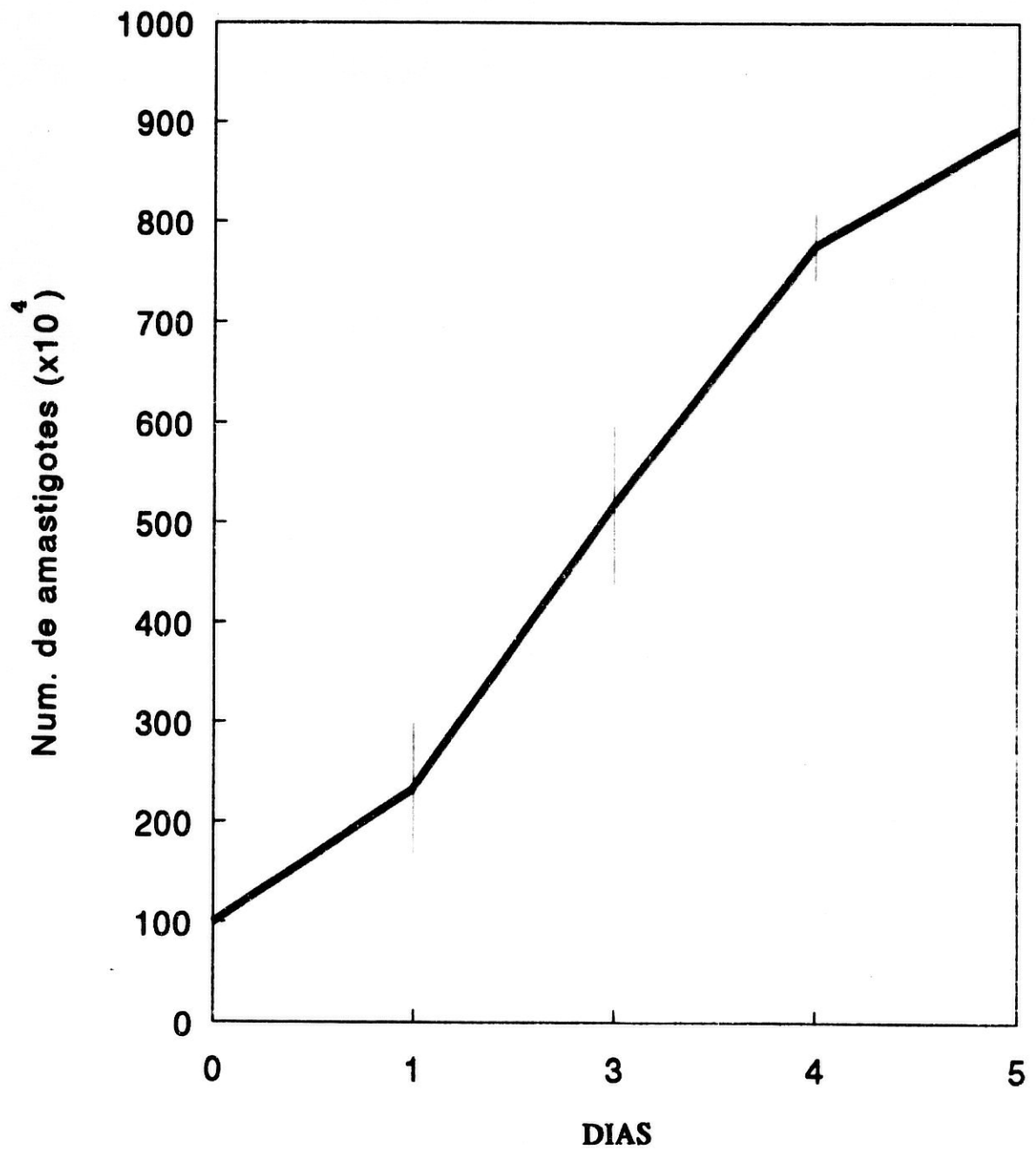


Figura nº 2: curva de crecimiento de formas amastigotes de *L. donovani* cultivadas a 37° C.

**3.B.- Obtención "in vitro" de formas amastigotas de *T. cruzi*.**

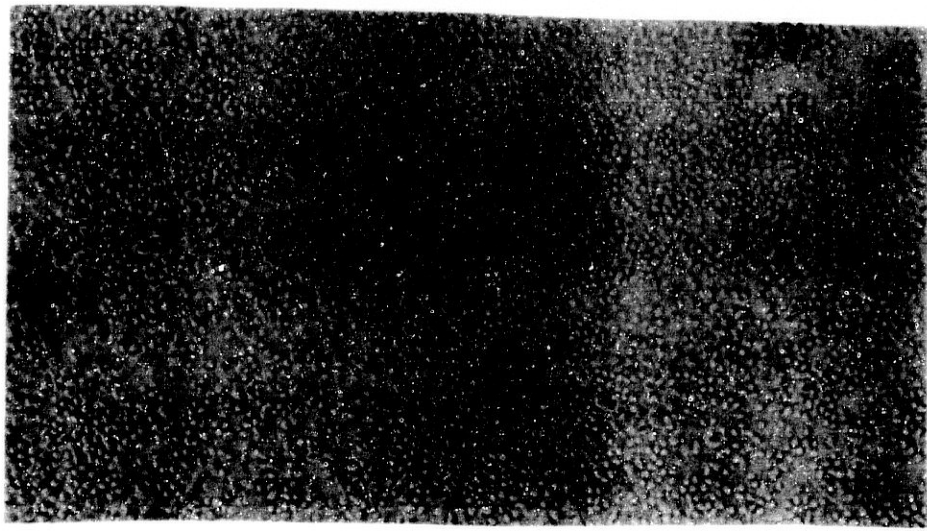
Las formas amastigotas de los parásitos fueron obtenidas según se indica en el apartado 2.A.2.D.

La fotografía nº 4 muestra formas amastigotas de *T. cruzi* obtenidas "in vitro" después de cuatro días de cultivo a 37° C.

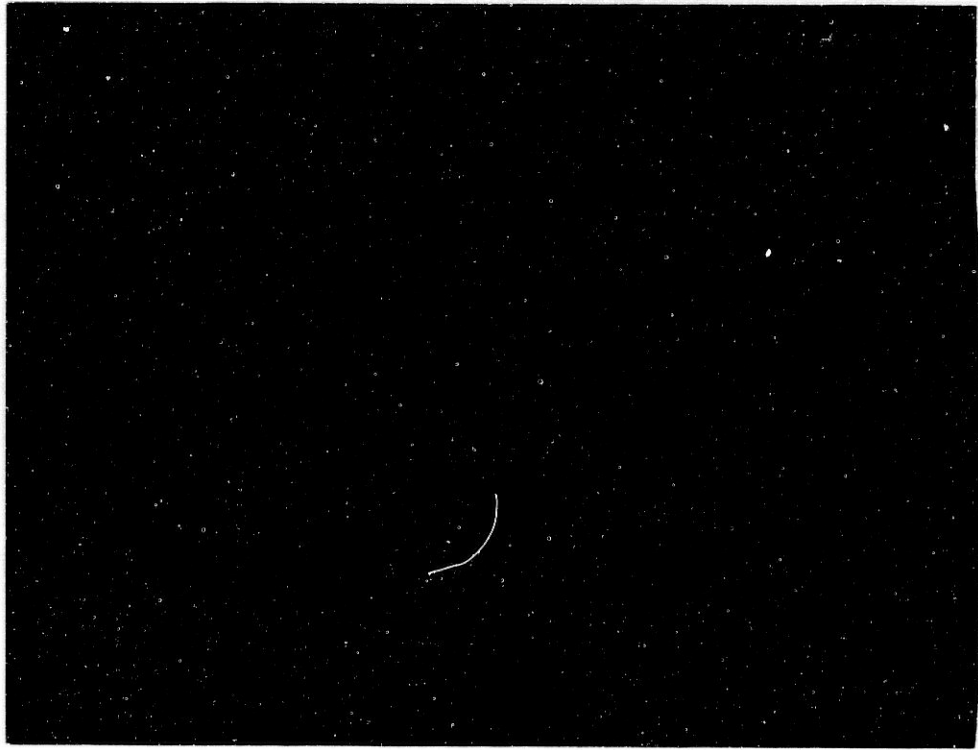
La fotografía nº 5 muestra una imagen al microscopio óptico de una tinción con Giemsa de formas de *T. cruzi* tras dos días de cultivo a 37° C, observándose ya formas amastigotas aflageladas.

La figura nº 3, muestra la transformación de formas metacíclicas *T. cruzi* en formas amastigotas tras el cambio de temperatura. Se representa también el cambio de pH que se produce durante la transformación.

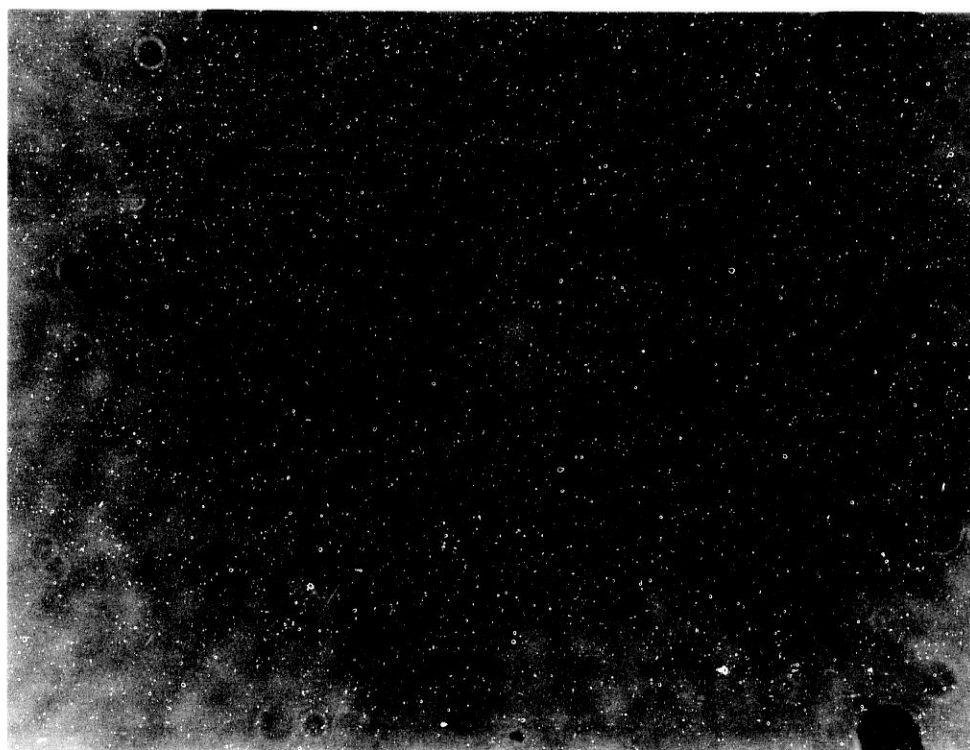
La figura nº 4, muestra la curva de crecimiento de las formas amastigotas de *T. cruzi*, cultivadas a 37° C y habiéndose purificado previamente como se indicó en el apartado 2.A.3.



**Fotografía nº 4: formas amastigotes de *T. cruzi* observadas al microscopio óptico (400 X) tras 4 días de cultivo a 37° C.**



**Fotografía nº 5: observación a microscopía óptica (1000 X) de formas amastigotes (A) de *T. cruzi* teñidas con Giemsa y obtenidas "in vitro" tras dos días de cultivo a 37° C.**



Fotografía nº 5: observación a microscopía óptica (1000 X) de formas amastigotes (A) de *T. cruzi* teñidas con Giemsa y obtenidas "in vitro" tras dos días de cultivo a 37° C.

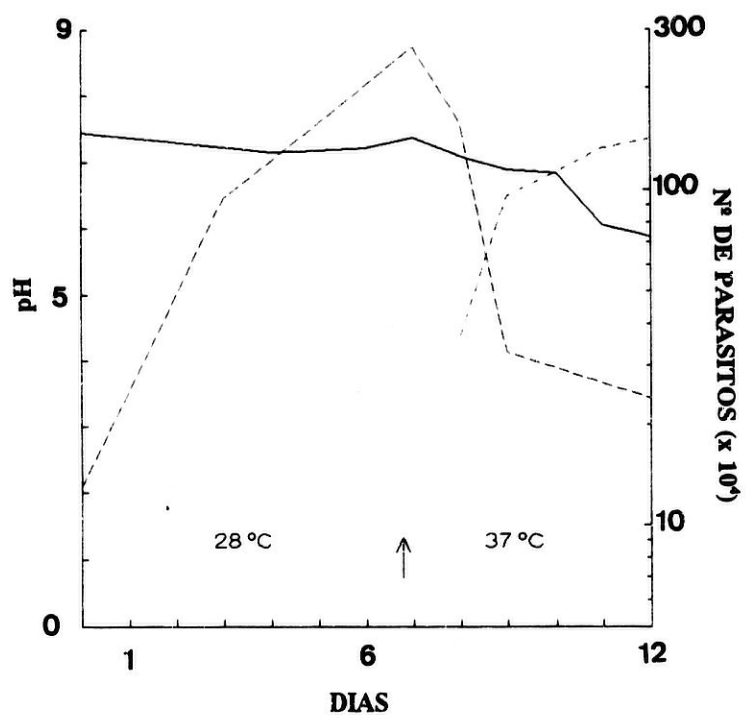


Figura nº 3: variación del pH y proceso de transformación en formas amastigotes de *T. cruzi* al cambiar la temperatura de cultivo de 28° C a 37° C. (— pH; --- proceso de transformación).

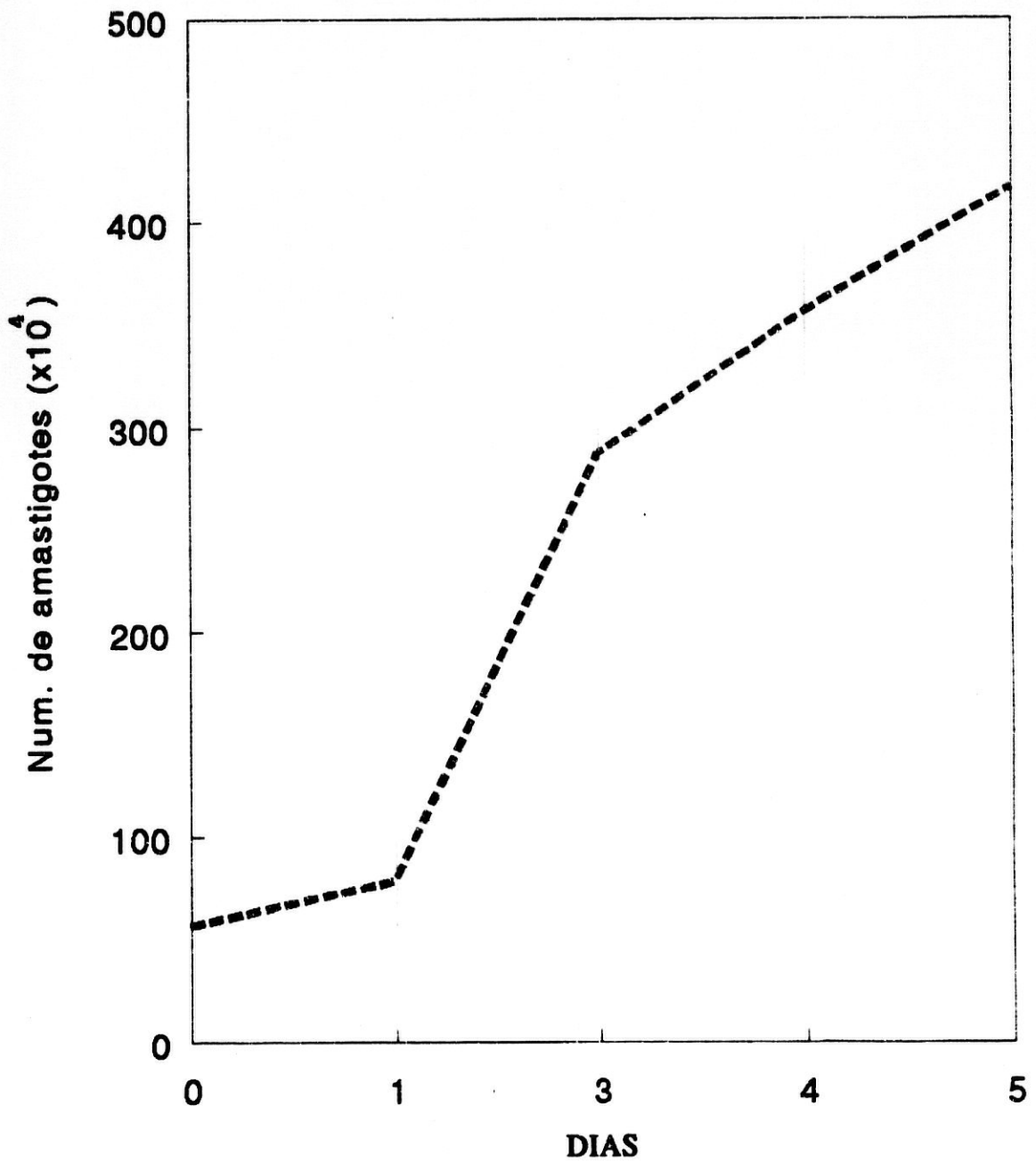


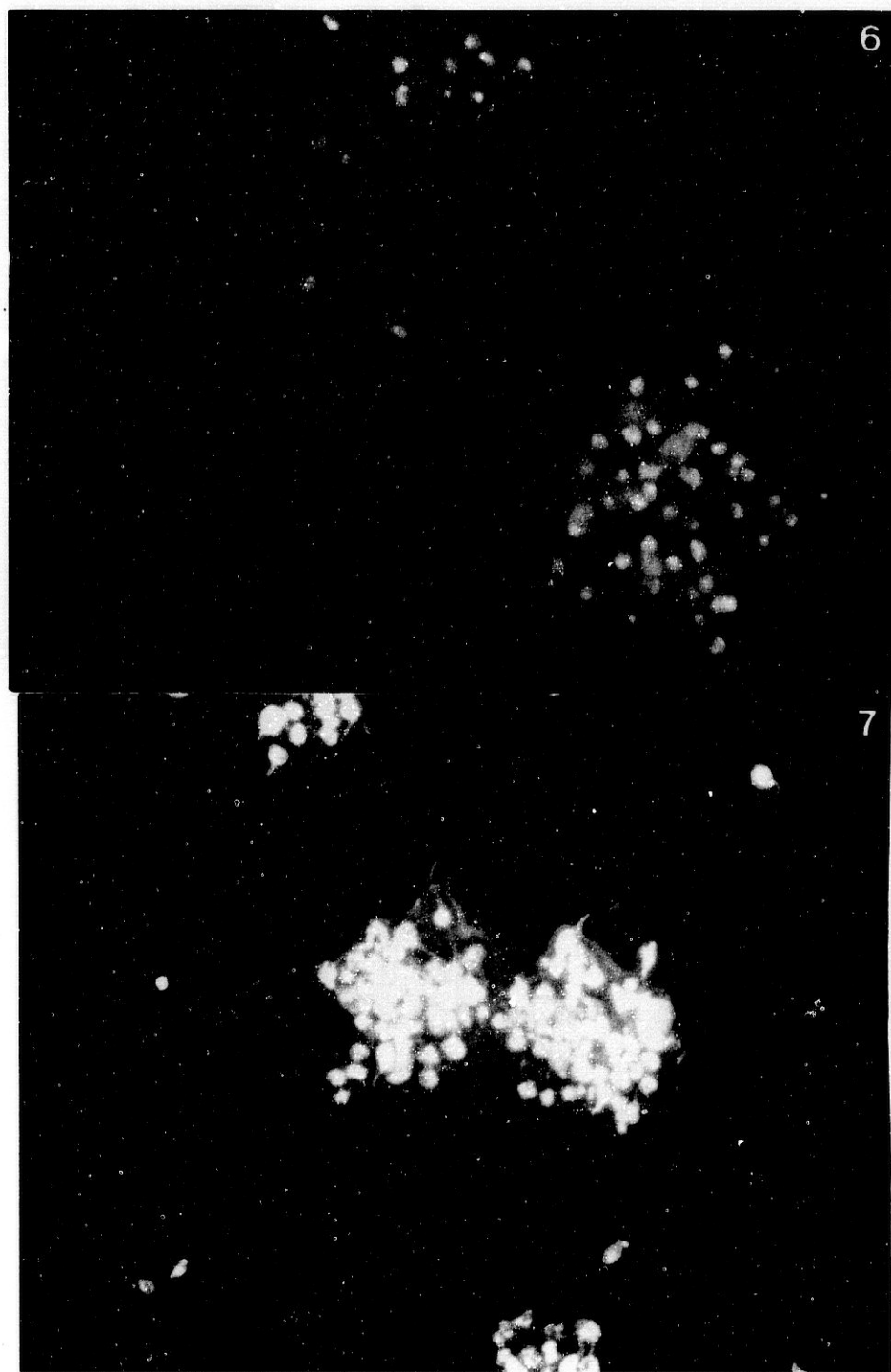
Figura n° 4: curva de crecimiento de formas amastigotes de *T. cruzi* cultivadas a 37° C.



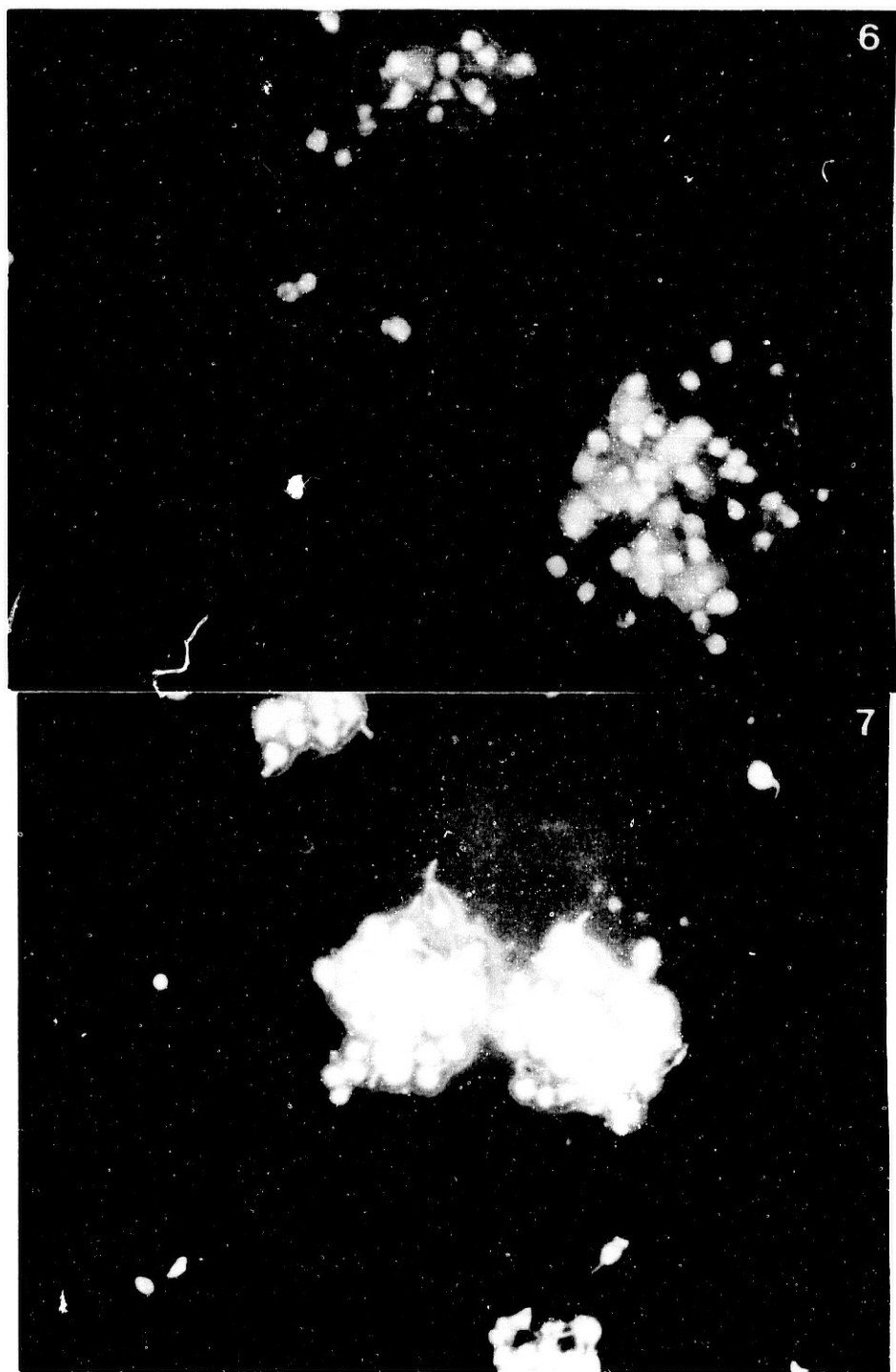
**3.C.- Determinación de la viabilidad de las formas amastigotas obtenidas "in vitro".**

La viabilidad de las formas amastigotas de ambas especies, obtenidas "in vitro" se determinó mediante dos procedimientos: tinción con naranja de acridina y determinación de la tasa de incorporación de Timidina [<sup>3</sup>H]. Las fotografías nº 6 y 7 muestran imágenes obtenidas al microscopio de fluorescencia de formas amastigotas de *T. cruzi* y de *L. donovani*, respectivamente, teñidas con naranja de acridina, siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 2.A.4.A. En el caso de las formas amastigota: de *L. donovani*, el porcentaje medio de células vivas fue del 83,7 %, y en el caso de las formas amastigotas de *T. cruzi* de un 74,3 %.

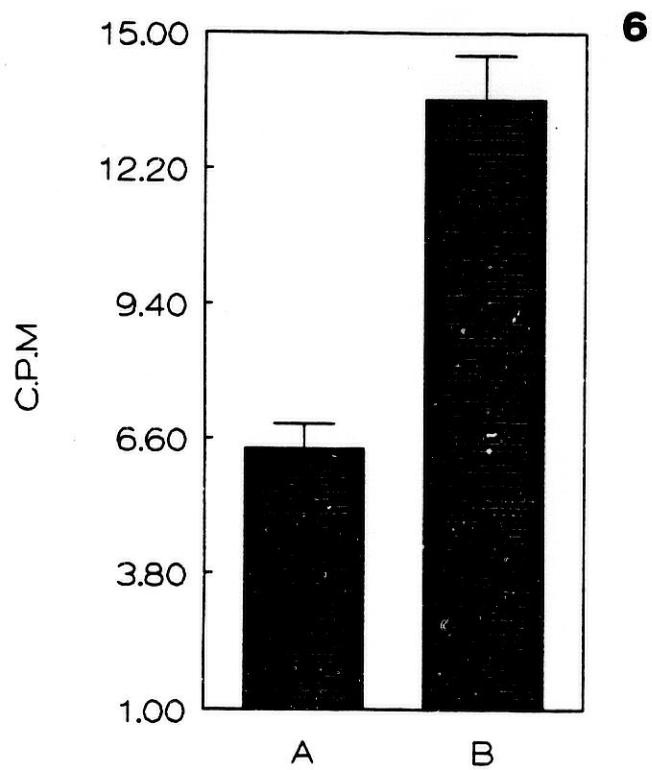
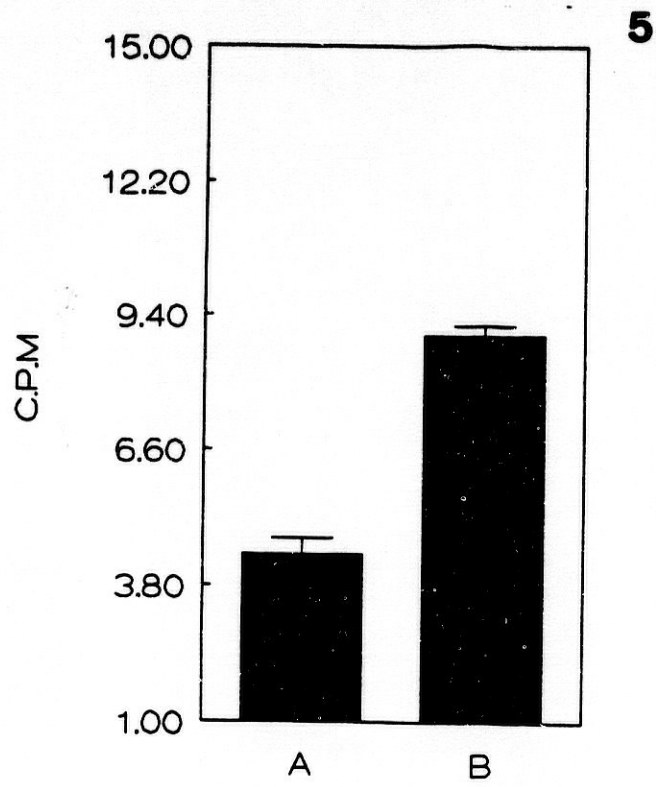
La incorporación de Timidina [<sup>3</sup>H] que presentan las formas amastigotas de *T. cruzi* y de *L. donovani* queda reflejada respectivamente en las figuras nº 5 y nº 6.



Fotografías nº 6 y 7: imágenes al microscopio de fluorescencia (1000 X) de formas amastigotes obtenidas "in vitro" de *T. cruzi* y *L. donovani*, respectivamente, tras ser sometidas a una tinción con naranja de acridina.



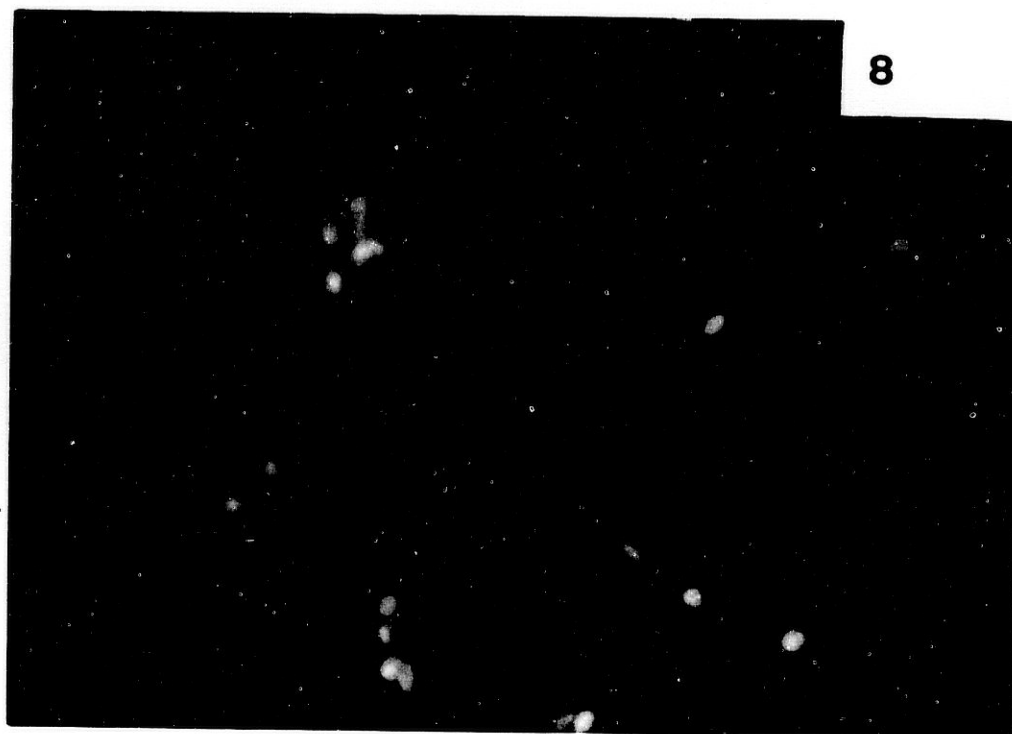
Fotografías nº 6 y 7: imágenes al microscopio de fluorescencia (1000 X) de formas amastigotes obtenidas "in vitro" de *T. cruzi* y *L. donovani*, respectivamente, tras ser sometidas a una tinción con naranja de acridina.



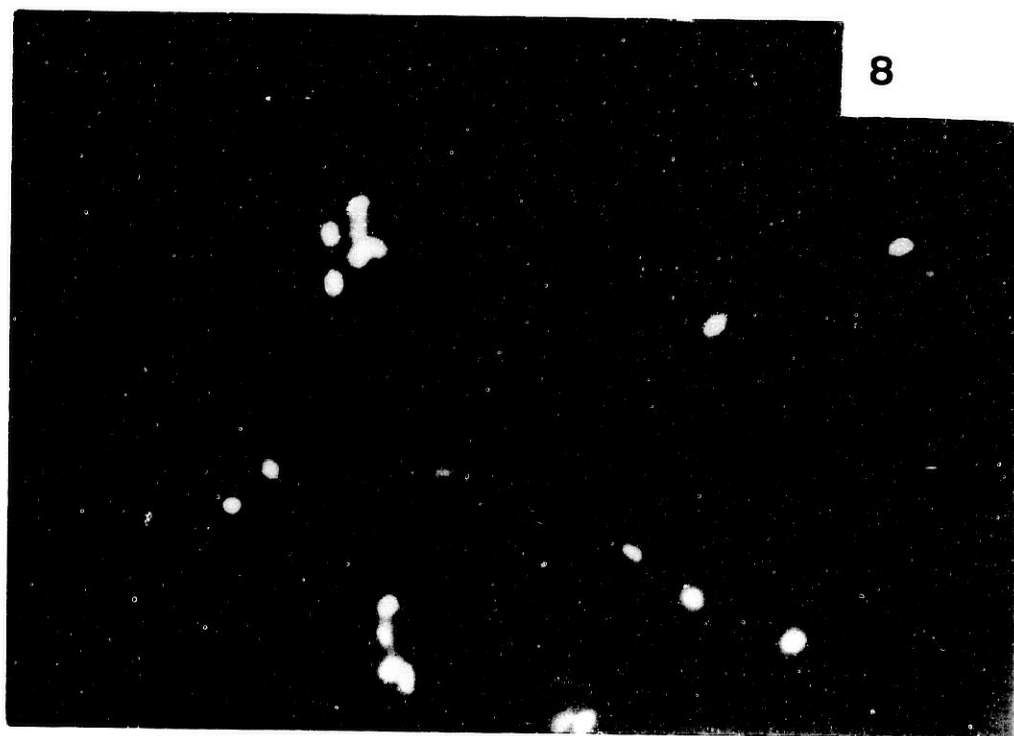
**Figuras nº 5 y 6: incorporación de Timidina [<sup>3</sup>H] por las formas amastigotes obtenidas "in vitro" de *T. cruzi* (5) y *L. donovani* (6). (A: 24 horas de cultivo. B: 48 horas de cultivo).**

**3.D.- Estudio antigénico de las formas amastigotas de *L. donovani* obtenidas "in vitro".**

Tal y como se indicó en el apartado 2.A.5. se realizaron estudios antigénicos de estas formas amastigotas obtenidas "in vitro". La fotografía nº 8 muestra imágenes al microscopio de fluorescencia, de los amastigotes de *L. donovani* tras ser sometidas a una inmunofluorescencia indirecta. La reacción fue positiva para una dilución de 1/356. El título del suero empleado fue de 1/200.



**Fotografía nº 8: imagen al microscopio de fluorescencia (1000 X) de formas amastigotes obtenidas "in vitro" de *L. donovani*, tras ser sometidas a una inmunofluorescencia indirecta.**

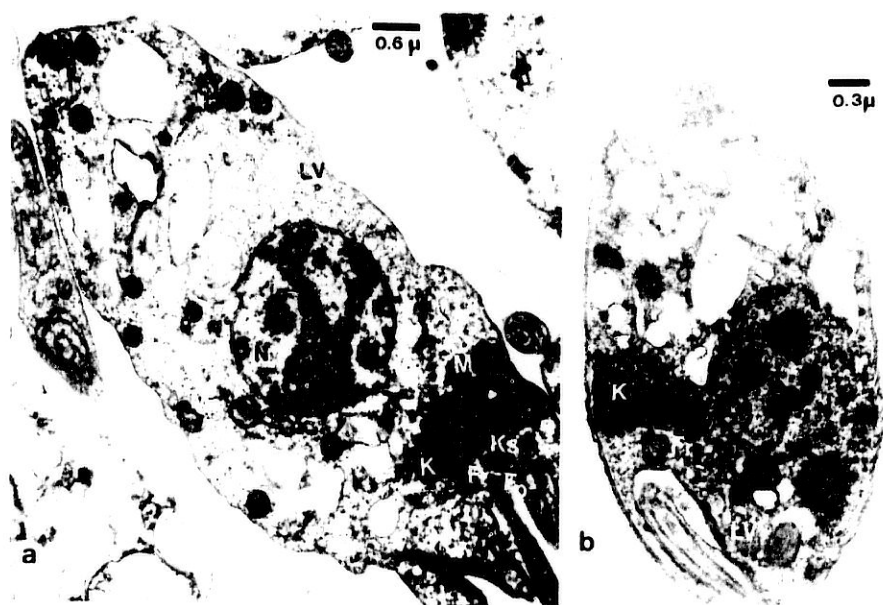


Fotografía nº 8: imagen al microscopio de fluorescencia (1000 X) de formas amastigotes obtenidas "in vitro" de *L. donovani*, tras ser sometidas a una inmunofluorescencia indirecta.

**3.E.- Estudio ultraestructural de las formas amastigotas de *L. donovani* obtenidas "in vitro".**

La fotografía nº 9 muestra dos imágenes obtenidas al microscopio electrónico (12000x) siguiendo el protocolo indicado en el apartado 2.D.1. La imagen 9.a corresponde a una forma promastigota de *L. donovani*, la imagen 9.b a una forma amastigota de *L. donovani* obtenida "in vitro".





Fotografía nº 9: formas promastigotas (a) y amastigotas (b) de *L. donovani*, observadas a microscopía electrónica de transmisión. (12000 X). [F=flagelo; Fp=bolsa flagelar; Fr=raíz flagelar; LV=vacuola lipídica; N=núcleo; M=mitocondria; K=kinetoplasto; Ks=saco del kinetoplasto; g=glicosoma].



A



B

Fotografía nº 10: forma amastigota (A) y epimastigota (B) de *T. cruzi.* , obtenidas "in vitro" y observadas a microscopía electrónica de transmisión. (12000 X). [F=flagelo; Fp=bolsa flagelar; M=mitocondria; N=núcleo; K=kinetoplasto].

**3.F.- Estudio ultraestructural de las formas amastigotas de *T. cruzi* obtenidas "in vitro".**

La fotografía nº 10.A corresponde a una imagen obtenida a microscopía electrónica de transmisión de una forma amastigota de *T. cruzi* obtenida "in vitro", siguiendo el protocolo indicado en el apartado 2.A.2.D.

La figura nº 10.B corresponde a una forma epimastigota del mismo parásito.

**3.H.- Estudios de [<sup>1</sup>H] Resonancia Magnética Nuclear de las formas amastigotas de *T. cruzi* obtenidas "in vitro".**

La figura nº 8 representa los espectros obtenidos en el caso de *T. cruzi*. La figura 8.a muestra el espectro del medio fresco TC-199 sin parásitos, y la figura nº 8.b muestra el espectro obtenido del análisis del medio de cultivo de las formas amastigotas obtenidas de *T. cruzi* "in vitro".

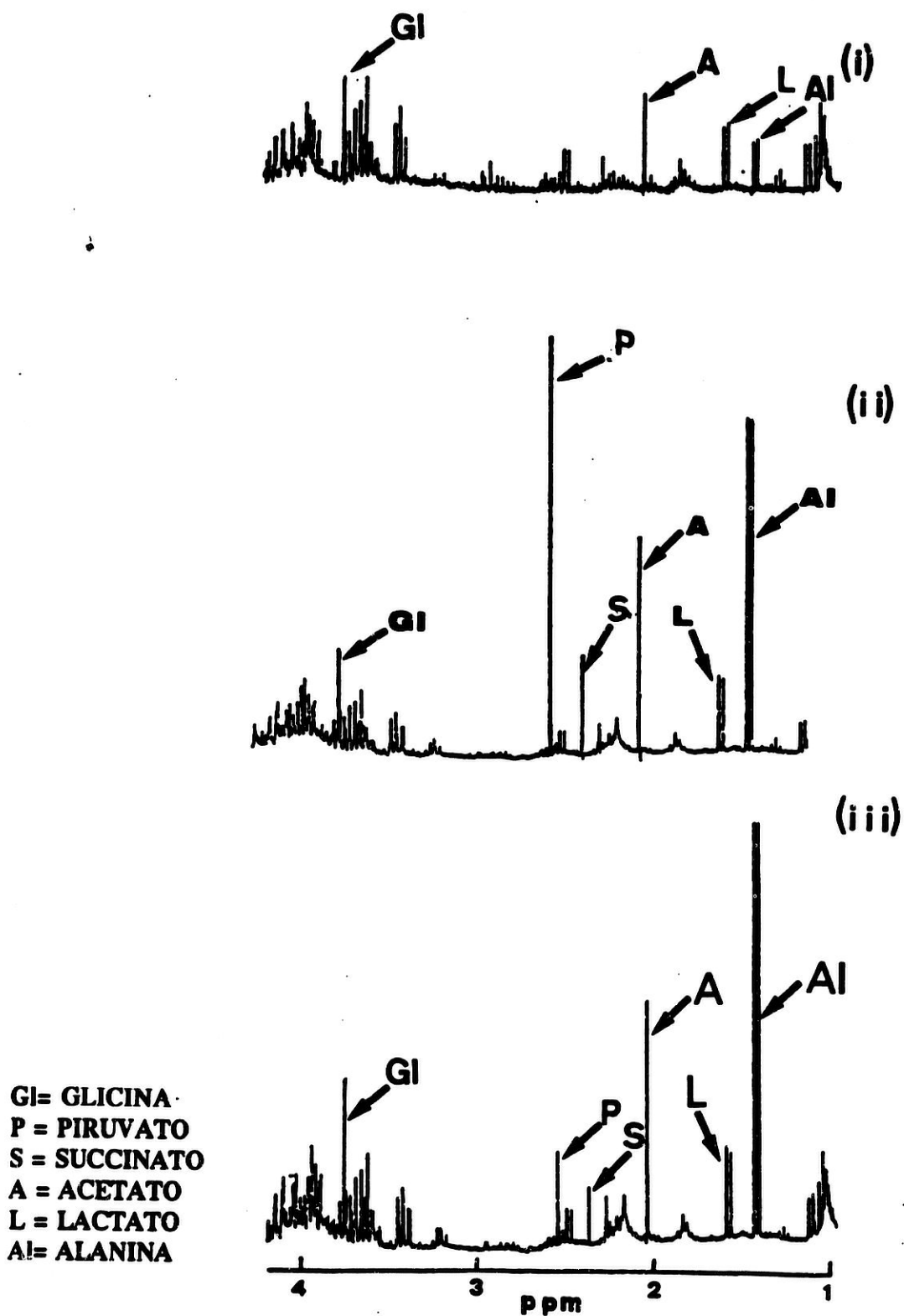


Figura nº7: espectros de Resonancia Magnética Nuclear [ $^1\text{H}$ ]. 7.i) Espectro del medio de cultivo TC-199 libre de parásito. 7.ii) Espectro del medio de cultivo de formas promastigotas de *L. donovani*. 7.iii) Espectro del medio de cultivo de formas amastigotas de *L. donovani* obtenidas "in vitro".

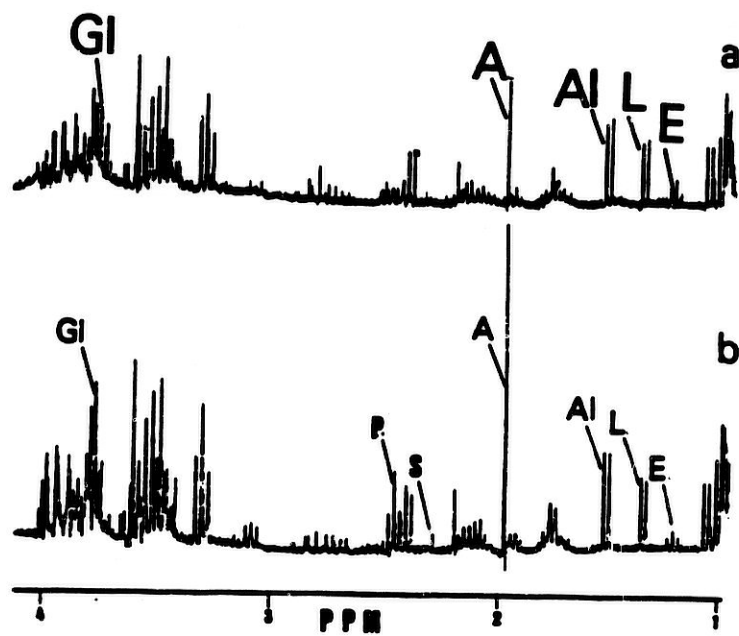


Figura n°8: espectros de Resonancia Magnética Nuclear [<sup>1</sup>H]. 8.a) Espectro del medio de cultivo TC-199 libre de parásito. 8.b) Espectro del medio de cultivo de formas amastigotas de *T. cruzi*. [GI=Glicina; P=Piruvato; S=Succinato; A=Acetato; Al=Alanina; L=Lactato].

**3.I.- Estudio de la infectividad de las formas amastigotas de *L. donovani* obtenidas "in vitro".**

La figura nº 9 muestra los porcentajes de parasitación y los índices de infección, obtenidos a las 24, 48 y 72 h, desde la infección de macrófagos J-774 con formas amastigotas de *L. donovani* obtenidas "in vitro". Se compara con los resultados obtenidos tras la infección con formas promastigotes del parásito.

El procedimiento para la infección se indicó en el apartado 2.A.B.

**3.I.- Estudio de la infectividad de las formas amastigotas de *L. donovani* obtenidas "in vitro".**

La figura nº 9 muestra los porcentajes de parasitación y los índices de infección, obtenidos a las 24, 48 y 72 h, desde la infección de macrófagos J-774 con formas amastigotas de *L. donovani* obtenidas "in vitro". Se compara con los resultados obtenidos tras la infección con formas promastigotes del parásito.

El procedimiento para la infección se indicó en el apartado 2.A.B.



|               | 24 h       |           | 48 h       |           | 72 h       |            |
|---------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|------------|
|               | <u>%P</u>  | <u>Ii</u> | <u>%P</u>  | <u>Ii</u> | <u>%P</u>  | <u>Ii</u>  |
| amastigotes   | 4.23±0.80  | 0.45±0.06 | 4.17±0.81  | 1.78±0.09 | 3.78±0.57  | 3.15±0.32  |
| promastigotes | 18.43±1.34 | 1.42±0.07 | 15.25±0.77 | 5.16±0.33 | 12.13±0.98 | 10.27±0.59 |

**Figura nº 9: infectividad de las formas amastigotes de *L. donovani* obtenidas "in vitro" frente a macrófagos J-774. [%P=porcentaje de parasitación. Ii=Índice de infección].**

**3.J. Acción de los complejos metálicos y derivados acridínicos frente a las formas epimastigotas de *T. cruzi*.**

El procedimiento seguido se indicó en el apartado 2.B.2.A., mostrándose los resultados en las Tablas nº 1 a nº 13.

Tabla 1: Efecto de complejos de Rh(III) [serie A] sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

| Tiempo de Incubación      | 24 Horas |      |      | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---------------------------|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|
|                           | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Rh(III)-Benzimidazole     | 0        | 0    | 0    | 32.7     | 7.5  | 0    | 59.3     | 8.5  | 1.4  |
| Rh(III)-2-Cl-Benzothiazol | 55.5     | 26.2 | 0    | 57.2     | 28.1 | 0    | 59.1     | 30.6 | 0    |
| Rh(III)-Amodiaquine       | 46.5     | 31.5 | 0    | 61.1     | 42.5 | 0    | 92.5     | 46.8 | 0    |
| Rh(III)-ketodipiridile    | 34.1     | 27.1 | 15.8 | 47.1     | 35.4 | 17.1 | 68.1     | 47.5 | 21.4 |
| Rh(III)-Niridazole        | 50.5     | 0    | 0    | 55.0     | 15.0 | 12.5 | 74.1     | 41.4 | 29.3 |
| Rh(III)-2-2'-Diquinoleina | 62.15    | 32.6 | 13.4 | 83.6     | 45.9 | 24.8 | 85.7     | 49.3 | 43.3 |
| Rh(III)-Mepacrine         | 71.20    | 56.9 | 29.7 | 75.8     | 58.5 | 35.8 | 78.8     | 59.4 | 45.9 |
| Rh(III)-Primaquine        | 44.5     | 0    | 0    | 82.5     | 53.5 | 16.2 | 86.2     | 58.7 | 26.1 |
| Rh(III)-1,4-DAP           | 20.6     | 14.0 | 0    | 37.6     | 23.4 | 5.4  | 50.5     | 27.2 | 6.7  |

Tabla 2: Efecto de complejos de Rh(III) [Serie B] sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

| Tiempo de Incubación<br>Concentración (µg/ml) | 24 Horas |      |   | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---|----------|------|---|----------|------|------|----------|------|------|
|   | 100      | 10   | 1 | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Rh(III)-Oxamiquina-Br                         | 0        | 0    | 0 | 54.1     | 0    | 0    | 66.3     | 41.5 | 30.5 |
| Rh(III)-Mepacrina-Br                          | 59.2     | 33.7 | 0 | 77.8     | 51.5 | 16.7 | 83.7     | 71.8 | 44.4 |
| Rh(III)-Prasiquantel-Br                       | 0        | 0    | 0 | 31.4     | 35.7 | 0    | 66.3     | 48.2 | 9.1  |
| Rh(III)-Amodiaquina-Br                        | 27.1     | 0    | 0 | 75.5     | 20.5 | 19.2 | 76.1     | 55.5 | 40.5 |



Tabla 4: Efecto de complejos de Rh(I) (serie D) sobre el crecimiento de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

| Tiempo de Incubación      | 24 Horas |      |      | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---------------------------|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|
|                           | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Rh(I)-COD-5,7-Dibromoxine | 38.9     | 31.1 | 31.1 | 70.9     | 41.9 | 40.1 | 96.5     | 68.1 | 60.1 |
| Rh(I)-COD-Mepacrine       | 26.0     | 24.4 | 0    | 83.1     | 71.2 | 60.6 | 91.4     | 78.7 | 67.1 |

Tabla 5: Efecto de complejos de Ir(I) [serie E] sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

| Tiempo de Incubación                | 24 Horas |      |      | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|-------------------------------------|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|
|                                     | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Ir(I)-COD-Pyrrolidinditiocarbamato  | 28.6     | 14.6 | 0.1  | 82.6     | 44.4 | 32.9 | 87.7     | 59.4 | 50.0 |
| Ir(I)-COD-5,7-Dibromoxine           | 39.4     | 37.5 | 0    | 76.4     | 65.4 | 29.5 | 97.1     | 81.6 | 46.9 |
| Ir(I)-Pentamidine-Benzylorange      | 84.4     | 74.9 | 39.5 | 87.4     | 81.2 | 49.5 | 96.9     | 82.4 | 77.6 |
| Ir(I)-COD-Primaquine-Ethilifumarato | 70.3     | 0    | 0    | 77.7     | 0    | 0    | 78.2     | 44.1 | 0    |
| Ir(I)-COD-5,7-Dibromoxine           | 71.1     | 12.1 | 36.1 | 72.9     | 38.2 | 0    | 87.0     | 43.1 | 23.1 |
| Ir(I)-COD-n-heptylthiocarboxylato   | 58.4     | 7.9  | 0    | 61.9     | 25.0 | 0    | 77.6     | 63.5 | 38.8 |
| Ir(I)-COD-Pentamidine-Methylorange  | 63.2     | 0    | 0    | 67.3     | 60.0 | 33.3 | 84.0     | 68.5 | 61.2 |

Tabla 6: Efecto de complejos de Ir(III) [serie F] sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

| Tiempo de Incubación<br>Concentración (µg/ml) | 24 Horas |      |     | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---|----------|------|-----|----------|------|------|----------|------|------|
|   | 100      | 10   | 1   | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Ir(III)-Isobutilizantato                      | 0        | 0    | 0   | 6.8      | 1.2  | 0    | 44.5     | 29.0 | 0    |
| Ir(III)-4-Carboxypirrolidindtc.               | 36.3     | 0    | 0   | 70.0     | 48.0 | 0    | 72.2     | 49.1 | 0    |
| Ir(III)-2Amino-4,5Dimetiliazolidtc.           | 15.7     | 0    | 0   | 46.4     | 5.8  | 0    | 58.7     | 38.8 | 0    |
| Ir(III)-Mepacrine                             | 30.2     | 26.0 | 4.1 | 55.2     | 39.2 | 20.3 | 56.9     | 40.7 | 58.8 |
| Ir(III)-Benznidazole                          | 30.6     | 21.9 | 0   | 47.5     | 27.2 | 0    | 50.9     | 36.1 | 16.7 |
| Ir(III)-Primaquine                            | 16.7     | 0    | 0   | 69.4     | 9.4  | 0    | 78.5     | 19.6 | 0    |
| Ir(III)-2-Amino-4-Clbenzimidazolidtc          | 26.3     | 0    | 0   | 37.5     | 0    | 0    | 59.3     | 2.5  | 13.7 |
| Ir(III)-Pyrrolidincarbonylate                 | 64.6     | 20.8 | 0   | 67.3     | 36.1 | 0    | 83.5     | 64.3 | 0    |
| Ir(III)-Ethylizantato                         | 100      | 100  | 100 | 100      | 100  | 100  | 100      | 100  | 100  |
| Ir(III)-Mefloquine                            | 61.2     | 0    | 0   | 62.1     | 38.4 | 30.0 | 91.1     | 58.2 | 51.8 |
| Ir(III)-Amodiaquine                           | 26.5     | 0    | 0   | 52.9     | 28.8 | 0    | 58.9     | 68.0 | 42.9 |
| Ir(III)-Leplidine                             | 10.9     | 0    | 0   | 58.2     | 62.4 | 41.9 | 81.8     | 70.0 | 60.0 |



Tabla 7: Efecto de complejos de Ir (IV) [serie G] sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

| Tiempo de Incubación   | 24 Horas |      |   | 48 Horas |      |   | 72 Horas |      |     |
|------------------------|----------|------|---|----------|------|---|----------|------|-----|
|                        | 100      | 10   | 1 | 100      | 10   | 1 | 100      | 10   | 1   |
| Concentración (µg/ml)  |          |      |   |          |      |   |          |      |     |
| Ir(IV)-Cl-Stilbamidina | 51.5     | 27.4 | 0 | 61.6     | 31.2 | 0 | 63.7     | 52.3 | 7.4 |
| Ir(IV)-RO              | 42.97    | 19.3 | 0 | 62.8     | 21.4 | 0 | 63.8     | 31.1 | 1.4 |

Tabla 8: Efecto de complejos de Pt(II) [serie H] sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

| Tiempo de Incubación<br>Concentración (µg/ml) | 24 Horas |      |   | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---|----------|------|---|----------|------|------|----------|------|------|
|   | 100      | 10   | 1 | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Pt(II)-Berenille                              | 24.6     | 15.1 | 0 | 30.1     | 25.1 | 0    | 69.3     | 32.8 | 10.0 |
| Pt(II)-Br-RO                                  | 65.2     | 47.0 | 0 | 85.7     | 69.5 | 41.4 | 98.7     | 98.0 | 63.7 |
| Pt(II)-Phenolrot                              | 62.6     | 0    | 0 | 63.1     | 39.4 | 31.4 | 64.8     | 60.1 | 41.4 |
| Pt(II)-Oxamiquina                             | 5.4      | 0    | 0 | 37.0     | 3.9  | 1.2  | 45.8     | 25.9 | 15.9 |
| Pt(II)-DAF-SSHS                               | 10.1     | 0    | 0 | 16.2     | 30.0 | 0    | 60.2     | 50.6 | 0    |

Tabla 9: Efecto de complejos de Pt(IV) [serie I] sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

| Tiempo de Incubación<br>Concentración (µg/ml) | 24 Horas |      |   | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---|----------|------|---|----------|------|------|----------|------|------|
|   | 100      | 10   | 1 | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Pt(IV)-Br-Berenille                           | 24.6     | 15.1 | 0 | 30.1     | 25.1 | 0    | 69.3     | 32.8 | 10.0 |
| Pt(IV)-Br-RO                                  | 65.2     | 47.0 | 0 | 85.7     | 69.5 | 41.4 | 98.7     | 98.0 | 63.7 |
| Pt(IV)-Br-Metamidium                          | 0        | 0    | 0 | 37.6     | 0    | 0    | 49.1     | 0    | 0    |

Tabla 10: Efecto de complejos de Ru(III) [serie J] sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

| Tiempo de Incubación<br>Concentración (µg/ml) | 24 Horas |      |      | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|
|   | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Ru(III)-Benzimidazol                          | 91.6     | 31.7 | 6.8  | 98.2     | 54.2 | 16.9 | 99.5     | 67.2 | 29.1 |
| Ru(III)-4-Nitrothiazol                        | 0        | 0    | 0    | 25.7     | 21.5 | 0    | 64.5     | 53.3 | 20.5 |
| Ru(III)-Ketoconazole                          | 0        | 0    | 0    | 0        | 0    | 0    | 45.8     | 36.5 | 7.5  |
| Ru(III)-Berenile                              | 9.5      | 0    | 0    | 15.6     | 0    | 0    | 48.8     | 0    | 0    |
| Ru(III)-Benzotiazol                           | 0        | 0    | 0    | 24.4     | 0    | 0    | 49.4     | 15.4 | 0    |
| Ru(III)-Ciclohexyl-Thiocarboxilate            | 13.7     | 0    | 0    | 71.5     | 50.7 | 6.8  | 91.8     | 77.8 | 46.8 |
| Ru(III)-2-Amino-Benzothiazol                  | 64.2     | 11.1 | 0    | 73.4     | 25.3 | 18.2 | 83.7     | 70.0 | 26.2 |
| Ru(III)-Primaquine                            | 96.3     | 73.3 | 13.3 | 100.0    | 83.9 | 22.1 | 100.0    | 91.0 | 43.5 |
| Ru(III)-Thiazol                               | 0        | 0    | 0    | 0        | 0    | 0    | 0        | 0    | 0    |
| Ru(III)-2,4-Dinitrothiazol                    | 0        | 0    | 0    | 48.8     | 10.3 | 0    | 64.7     | 17.2 | 0    |
| Ru(III)-4-Mitroimidazol                       | 31.68    | 6.9  | 0    | 52.1     | 23.6 | 13.5 | 63.5     | 48.2 | 25.3 |
| Ru(III)-Imidazol                              | 8.9      | 0    | 0    | 28.2     | 0    | 0    | 37.6     | 0    | 0    |

Tabla 11: Efecto de complejos de Os(III) [serie K] sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

| Tiempo de Incubación<br>Concentración (µg/ml) | 24 Horas |      |      | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|
|   | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Os(III)-2,4-Dinitroimidazoldtc.               | 79.6     | 43.7 | 8.5  | 94.1     | 50.0 | 27.5 | 94.7     | 67.7 | 35.4 |
| Os(III)-2-Nitroimidazoldtc.                   | 50.0     | 41.5 | 12.9 | 66.7     | 42.4 | 36.8 | 75.4     | 47.8 | 38.7 |
| Os(III)-Piperazin                             | 37.5     | 11.1 | 5.1  | 42.4     | 30.0 | 20.3 | 48.1     | 66.7 | 30.5 |
| Os(III)-Morfolindtc.                          | 0        | 0    | 0    | 2.0      | 0    | 0    | 62.5     | 0    | 0    |
| Os(III)-2-Hidroxiethylpírolidindtc            | 27.3     | 0    | 0    | 46.2     | 0    | 0    | 57.9     | 5.6  | 0    |
| Os(III)-Anilinditiocarbamato                  | 25.9     | 7.1  | 0    | 84.8     | 17.5 | 0    | 85.0     | 42.6 | 3.7  |
| Os(III)-2-Amino-6-Bromotiazoldtc              | 61.9     | 0    | 0    | 61.4     | 3.4  | 0    | 27.1     | 3.4  | 0    |
| Os(III)-5-Carboxypyrolidindtc.                | 42.9     | 10.7 | 0    | 45.2     | 18.8 | 0    | 68.8     | 19.0 | 0    |
| Os(III)-2,5-Dimetil-Anilindtc.                | 73.4     | 0    | 0    | 0        | 0    | 0    | 0        | 0    | 0    |
| Os(III)-4-Nitroimidazol                       | 81.0     | 53.2 | 0    | 74.0     | 54.1 | 0    | 95.3     | 63.6 | 44.3 |
| Os(III)-Benzimidazoldtc.                      | 25.9     | 7.1  | 0    | 84.8     | 17.5 | 0    | 85.0     | 42.6 | 3.7  |

**Tabla 12: Efecto de Ligandos Puros sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.**

| Tiempo de Incubación          | 24 Horas |      |   | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|-------------------------------|----------|------|---|----------|------|------|----------|------|------|
|                               | 100      | 10   | 1 | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Concentración (µg/ml)         |          |      |   |          |      |      |          |      |      |
| AMILINDITIOCAPMATO DE POTASIO | 0        | 0    | 0 | 54.0     | 43.9 | 10.1 | 64.7     | 50.6 | 18.0 |
| EPITANTATO DE POTASIO         | 47.5     | 39.2 | 0 | 65.8     | 42.5 | 0    | 74.1     | 52.9 | 0    |

Tabla 13: Efecto de los derivados acridínicos sobre el crecimiento de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

| Tiempo de Incubación<br>Concentración (µg/ml) | 24 Horas |      |      | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|
|   | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| BG-203  | 100      | 100  | 70   | 100      | 100  | 93.4 | 100      | 100  | 100  |
| BG-237  | 100      | 100  | 67.9 | 100      | 100  | 77.7 | 100      | 100  | 100  |
| BG-289  | 100      | 100  | 100  | 100      | 100  | 100  | 100      | 100  | 100  |
| BG-314  | 100      | 100  | 100  | 100      | 100  | 100  | 100      | 100  | 100  |
| BG-405  | 60.4     | 28.2 | 0    | 71.2     | 43.4 | 24.2 | 74.2     | 52.2 | 33.3 |
| BG-444  | 32.4     | 0    | 0    | 41.2     | 0    | 0    | 47.7     | 10.1 | 0    |
| BG-451  | 100      | 47.1 | 18.4 | 100      | 69.2 | 19.5 | 100      | 100  | 33.2 |
| BG-460  | 100      | 84.2 | 80.4 | 100      | 100  | 100  | 100      | 100  | 100  |
| BG-493  | 90.2     | 71.4 | 70.8 | 95.4     | 80.9 | 79.2 | 99.4     | 85.2 | 80.2 |
| BG-498  | 100      | 100  | 100  | 100      | 100  | 100  | 100      | 100  | 100  |
| BG-506  | 83.2     | 80.5 | 69.2 | 92.4     | 90.2 | 76.5 | 100      | 100  | 100  |
| BG-514  | 33.4     | 20.4 | 7.1  | 52.6     | 22.2 | 10.4 | 79.9     | 40.2 | 15.2 |
| BG-515  | 27.2     | 0    | 0    | 64.8     | 0    | 0    | 80.2     | 22.4 | 0    |
| BG-529  | 0        | 0    | 0    | 0        | 0    | 0    | 22.4     | 1.8  | 0    |
| BG-530  | 31.8     | 0    | 0    | 33.4     | 0    | 0    | 54.1     | 16.4 | 2.4  |

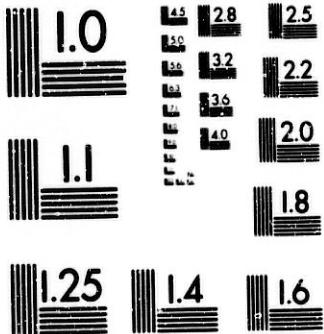
**3.K. Acción de los complejos metálicos y derivados acridínicos frente a las formas promastigotas de *L. donovani*.**

El procedimiento seguido se indicó en el apartado 2.B.2.A., y los resultados se muestran en las Tablas nº 14 a nº 26.



Tabla 14: Efecto de complejos de Rh(III) (serie A) sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.

| Tiempo de Incubación<br>Concentración (µg/ml) | 24 Horas |      |      | 48 Horas |      |      | 72 Horas |       |      |
|---|----------|------|------|----------|------|------|----------|-------|------|
|   | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    | 100      | 10    | 1    |
| Rh(III)-Benzimidazole                         | 55.7     | 9.8  | 2.1  | 57.0     | 19.9 | 10.3 | 60.1     | 37.3  | 13.2 |
| Rh(III)-2-Cl-Benzothiazol                     | 39.9     | 21.6 | 0    | 50.5     | 32.7 | 0    | 54.5     | 34.7  | 2.6  |
| Rh(III)-Amodiaquine                           | 90.6     | 45.1 | 12.9 | 95.7     | 61.6 | 42.0 | 100.0    | 70.5  | 62.6 |
| Rh(III)-ketodipiridile                        | 65.1     | 13.1 | 0    | 71.3     | 47.1 | 24.0 | 90.3     | 66.2  | 31.5 |
| Rh(III)-Niridazole                            | 28.9     | 0    | 0    | 51.6     | 12.5 | 0    | 78.7     | 56.7  | 21.4 |
| Rh(III)-2-2'-Diquinolaina                     | 89.5     | 31.9 | 5.9  | 89.9     | 76.9 | 52.5 | 90.3     | 82.3  | 61.3 |
| Rh(III)-Mepacrine                             | 100.0    | 90.4 | 70.4 | 100.0    | 98.7 | 90.5 | 100.0    | 100.0 | 93.7 |
| Rh(III)-Primaquine                            | 0        | 0    | 0    | 0        | 0    | 0    | 0        | 0     | 0    |
| Rh(III)-1,4-DAP                               | 35.9     | 13.1 | 10.0 | 60.0     | 25.4 | 17.3 | 74.7     | 53.5  | 37.6 |



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART  
 NATIONAL BUREAU OF STANDARDS  
 STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a  
 (ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

Tabla 14: Efecto de complejos de Rh(III) [serie A] sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.

| Tiempo de Incubación      | 24 Horas |      |      | 48 Horas |      |      | 72 Horas |       |      |
|---------------------------|----------|------|------|----------|------|------|----------|-------|------|
|                           | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    | 100      | 10    | 1    |
| Rh(III)-Benzimidazole     | 55.7     | 9.8  | 2.1  | 57.0     | 19.9 | 10.8 | 60.1     | 37.3  | 13.2 |
| Rh(III)-2-Cl-Benzothiazol | 39.9     | 21.6 | 0    | 50.5     | 32.7 | 0    | 54.5     | 34.7  | 2.6  |
| Rh(III)-Amodiaquine       | 90.6     | 45.1 | 12.9 | 95.7     | 61.6 | 42.0 | 100.0    | 70.5  | 62.6 |
| Rh(XII)-ketodipridile     | 65.1     | 13.1 | 0    | 71.3     | 47.1 | 24.0 | 90.3     | 66.2  | 31.5 |
| Rh(III)-Miridazole        | 28.9     | 0    | 0    | 51.6     | 12.5 | 0    | 78.7     | 56.7  | 21.4 |
| Rh(III)-2-2'-Diquinoleina | 89.5     | 31.9 | 5.9  | 89.9     | 76.9 | 52.5 | 90.3     | 82.3  | 61.3 |
| Rh(III)-Mepacrine         | 100.0    | 90.4 | 70.4 | 100.0    | 98.7 | 90.5 | 100.0    | 100.0 | 93.7 |
| Rh(III)-Prlmaquine        | 0        | 0    | 0    | 0        | 0    | 0    | 0        | 0     | 0    |
| Rh(III)-1,4-DAP           | 35.9     | 13.1 | 10.0 | 60.0     | 25.4 | 17.3 | 74.7     | 53.5  | 37.6 |

Tabla 15: Efecto de complejos de Rh(III) [serie B] sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.

| Tiempo de Incubación<br>Concentración (µg/ml) | 24 Horas |      |      | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|
|   | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Rh(III)-Oxamiquine-Br                         | 25.3     | 0    | 0    | 30.9     | 18.7 | 0    | 41.1     | 24.7 | 17.0 |
| Rh(III)-Mepacrine-Br                          | 51.6     | 0    | 0    | 77.5     | 47.8 | 24.6 | 93.7     | 75.9 | 46.6 |
| Rh(III)-Prasiquantel-Br                       | 0        | 0    | 0    | 21.2     | 0    | 0    | 30.3     | 25.2 | 19.9 |
| Rh(III)-Amodiaquine-Br                        | 81.9     | 41.9 | 23.5 | 96.4     | 56.0 | 27.1 | 96.8     | 63.5 | 29.5 |



Tabla 17: Efecto de complejos de Rh(I) [serie D] sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.

| Tiempo de Incubación      | 24 Horas |      |      | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---------------------------|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|
|                           | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Concentración (µg/ml)     |          |      |      |          |      |      |          |      |      |
| Rh(I)-COD-5,7-Dibromoxine | 75.8     | 71.7 | 17.3 | 91.0     | 79.3 | 56.2 | 95.8     | 84.0 | 66.6 |
| Rh(I)-COD-Mepacrine       | 81.5     | 37.8 | 20.1 | 83.5     | 70.2 | 37.1 | 84.4     | 78.1 | 64.7 |

Tabla 18: Efecto de complejos de Ir(I) (serie E) sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.

| Tiempo de Incubación<br>Concentración (µg/ml) | 24 Horas |      |      | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|
|   | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Ir(I)-COD-Pyrolidindillocarbamato             | 99.0     | 79.2 | 73.2 | 99.0     | 85.3 | 76.4 | 98.2     | 93.2 | 85.5 |
| Ir(I)-COD-5,7-Dibromoxina                     | 88.9     | 21.6 | 0    | 94.3     | 39.4 | 0    | 96.9     | 41.9 | 18.7 |
| Ir(I)-Pentamidina-Benzylorange                | 56.8     | 54.5 | 0    | 83.1     | 76.9 | 66.8 | 96.4     | 91.8 | 88.6 |
| Ir(I)-COD-Primaquine-Ethilifumarato           | 0        | 0    | 0    | 0        | 0    | 0    | 10.1     | 1.5  | 0    |
| Ir(I)-COD-5,7-Dibromoxina                     | 45.4     | 30.9 | 0    | 53.9     | 31.9 | 15.2 | 30.5     | 15.0 | 0    |
| Ir(I)-COD-n-heptylthiocarboxylato             | 49.4     | 16.5 | 0    | 55.5     | 28.5 | 5.9  | 69.5     | 35.4 | 10.0 |
| Ir(I)-COD-Pentamidina-Methylorange            | 16.8     | 6.5  | 0    | 22.4     | 7.3  | 0    | 88.7     | 85.8 | 81.6 |

**Tabla 19: Efecto de complejos de Ir(III) [serie F] sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.**

| Tiempo de Incubación                  | 24 Horas |      |      | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---------------------------------------|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|
|                                       | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Ir(III)-Isobutirato                   | 80.5     | 52.8 | 19.6 | 95.8     | 66.3 | 0    | 100.0    | 79.3 | 54.2 |
| Ir(III)-4-Carboxipirrolidindtc.       | 88.8     | 72.1 | 47.6 | 90.0     | 80.2 | 76.1 | 92.8     | 92.7 | 84.2 |
| Ir(III)-2-Amino-4,5-Dimetiltiazoldtc. | 1.2      | 0    | 0    | 53.7     | 24.8 | 0    | 58.8     | 29.5 | 21.2 |
| Ir(III)-Mepacrine                     | 88.6     | 19.6 | 0    | 89.2     | 36.5 | 23.6 | 90.9     | 52.8 | 37.2 |
| Ir(III)-Benzimidazole                 | 13.3     | 0    | 0    | 31.1     | 30.4 | 10.8 | 45.9     | 39.4 | 25.2 |
| Ir(III)-Primaquine                    | 50.3     | 21.8 | 0    | 87.6     | 82.6 | 59.6 | 93.6     | 83.7 | 71.6 |
| Ir(III)-2-Amino-4-Cl-Benzimidazoldtc  | 10.9     | 0    | 0    | 52.7     | 26.1 | 0    | 58.7     | 26.9 | 8.9  |
| Ir(III)-Pyrrolidincarboxylate         | 0        | 0    | 0    | 10.1     | 0    | 0    | 93.6     | 73.7 | 23.8 |
| Ir(III)-Ethyloxantato                 | 100      | 100  | 100  | 100      | 100  | 100  | 100      | 100  | 100  |
| Ir(III)-MeFloquine                    | 55.5     | 46.4 | 13.6 | 91.2     | 74.2 | 55.1 | 93.5     | 88.7 | 81.5 |
| Ir(III)-Amodiaquine                   | 75.2     | 11.8 | 0    | 92.9     | 88.9 | 69.7 | 95.5     | 90.2 | 70.2 |
| Ir(III)-Lapidine                      | 35.5     | 29.1 | 0    | 75.3     | 64.0 | 42.7 | 89.7     | 87.9 | 70.9 |



Tabla 20: Efecto de complejos de Ir(IV) [serie G] sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.

| Tiempo de Incubación   | 24 Horas |      |   | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|------------------------|----------|------|---|----------|------|------|----------|------|------|
|                        | 100      | 10   | 1 | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Concentración (µg/ml)  | 100      | 10   | 1 | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Ir(IV)-Cl-Stilbamidina | 65.7     | 25.0 | 0 | 68.9     | 38.4 | 10.5 | 88.1     | 62.9 | 41.6 |
| Ir(IV)-RO              | 0        | 0    | 0 | 0        | 0    | 0    | 13.4     | 0    | 0    |

Tabla 21: Efecto de complejos de Pt(II) [serie H] sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.

| Tiempo de Incubación<br>Concentración (µg/ml) | 24 Horas |      |     | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---|----------|------|-----|----------|------|------|----------|------|------|
|   | 100      | 10   | 1   | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Pt(II)-Berenil                                | 37.9     | 23.1 | 8.9 | 45.3     | 26.8 | 13.4 | 62.6     | 32.7 | 20.8 |
| Pt(II)-Br-RO                                  | 72.1     | 67.4 | 6.9 | 83.7     | 72.9 | 53.8 | 99.1     | 86.7 | 67.9 |
| Pt(II)-Phenolrot                              | 1.5      | 0    | 0   | 15.2     | 0    | 0    | 24.0     | 5.0  | 0    |
| Pt(II)-Oxamiquina                             | 68.2     | 0    | 0   | 72.8     | 0    | 0    | 94.3     | 0    | 0    |
| Pt(II)-DAP-SSHS                               | 18.7     | 7.8  | 0   | 79.7     | 28.2 | 1.5  | 86.2     | 45.7 | 15.7 |

Tabla 22: Efecto de complejos de Pt(IV) [serie I] sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.

| Tiempo de Incubación<br>Concentración (µg/ml) | 24 Horas |      |     | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---|----------|------|-----|----------|------|------|----------|------|------|
|   | 100      | 10   | 1   | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Pt(IV)-Br-Berenil                             | 20.3     | 0    | 0   | 27.3     | 2.4  | 0    | 39.1     | 15.6 | 5.6  |
| Pt(IV)-Br-RO                                  | 0        | 0    | 0   | 83.3     | 69.6 | 23.2 | 98.9     | 71.2 | 42.5 |
| Pt(IV)-Br-Metamidium                          | 68.2     | 33.6 | 2.0 | 84.1     | 83.8 | 55.1 | 87.4     | 84.2 | 69.5 |

Tabla 23: Efecto de complejos de Ru(III) [serie J] sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.

| Tiempo de Incubación               | 24 Horas |      |     | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|------------------------------------|----------|------|-----|----------|------|------|----------|------|------|
|                                    | 100      | 10   | 1   | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Ru(III)-Benzimidazol               | 74.7     | 16.5 | 0   | 81.8     | 54.4 | 0    | 98.9     | 60.7 | 0    |
| Ru(III)-4-Nitrotiazol              | 88.2     | 41.7 | 5.8 | 96.5     | 48.1 | 27.4 | 100.0    | 54.6 | 34.7 |
| Ru(III)-Ketoconazole               | 22.4     | 0    | 0   | 31.2     | 4.6  | 0    | 42.3     | 16.8 | 0    |
| Ru(III)-Beremile                   | 12.7     | 0    | 0   | 32.9     | 1.2  | 0    | 90.4     | 4.9  | 0    |
| Ru(III)-Benzotiazol                | 59.7     | 0    | 0   | 82.9     | 0    | 0    | 93.1     | 46.4 | 29.4 |
| Ru(III)-Ciclohexyl-Thiocarbonylate | 31.2     | 0    | 0   | 45.5     | 1.4  | 0    | 75.6     | 41.7 | 19.5 |
| Ru(III)-2-Amino-Benzothiazol       | 12.5     | 9.3  | 0   | 93.5     | 18.1 | 0    | 96.6     | 28.1 | 0    |
| Ru(III)-Primaquine                 | 51.6     | 36.8 | 0   | 73.9     | 62.3 | 34.8 | 94.5     | 81.5 | 47.2 |
| Ru(III)-Thiazol                    | 62.5     | 26.9 | 2   | 82.6     | 55.1 | 40.6 | 85.4     | 73.2 | 52.7 |
| Ru(III)-2,4-Dinitrotiazol          | 54.6     | 16.4 | 0   | 62.4     | 42.5 | 31.1 | 78.7     | 56.7 | 35.0 |
| Ru(III)-4-Nitroimidazol            | 16.8     | 0    | 0   | 28.2     | 2.9  | 0    | 59.6     | 15.3 | 0    |
| Ru(III)-Imidazol                   | 43.8     | 24.9 | 0   | 45.5     | 25.5 | 0    | 51.1     | 30.5 | 0    |

Tabla 24: Efecto de complejos de Os(III) [serie K] sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.

| Tiempo de Incubación               | 24 Horas |      |      | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|------------------------------------|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|
|                                    | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| Os(III)-2,4-Dinitroimidazoldtc.    | 63.7     | 0    | 0    | 71.9     | 37.7 | 12.5 | 90.6     | 84.1 | 76.4 |
| Os(III)-2-Nitroimidazoldtc.        | 65.9     | 3.1  | 0    | 79.2     | 76.7 | 70.7 | 84.3     | 81.2 | 71.7 |
| Os(III)-Piperazin                  | 0        | 0    | 0    | 0        | 0    | 0    | 30.7     | 15.8 | 0    |
| Os(III)-Morfolindtc.               | 14.1     | 18.7 | 0    | 60.1     | 39.1 | 18.5 | 98.0     | 85.8 | 58.3 |
| Os(III)-2-Hidroxiethylpírolidindtc | 56.2     | 13.6 | 3.8  | 79.7     | 63.8 | 30.4 | 91.7     | 75.6 | 70.5 |
| Os(III)-Anilinditlocarbamato       | 32.2     | 31.8 | 5.3  | 68.1     | 37.7 | 10.9 | 88.2     | 77.2 | 56.4 |
| Os(III)-Benzimidazolditlocarbamato | 81.3     | 19.7 | 0    | 91.3     | 72.5 | 54.3 | 93.7     | 90.9 | 85.3 |
| Os(III)-5-Carboxypyrolidindtc.     | 0        | 0    | 0    | 85.4     | 60.7 | 74.5 | 94.3     | 65.3 | 34.6 |
| Os(III)-2,5-Dimetil-Anilindtc.     | 10.2     | 0    | 0    | 20.1     | 1.9  | 0    | 51.1     | 12.6 | 0    |
| Os(III)-4-Nitroimidazoldtc.        | 56.7     | 33.6 | 0    | 72.1     | 43.9 | 10.9 | 96.5     | 83.9 | 74.4 |
| Os(III)-2Amino6BrBenzothiazoldtc.  | 77.3     | 25.5 | 28.2 | 90.6     | 84.4 | 81.0 | 96.1     | 91.0 | 82.3 |

**Tabla 25: Efecto de Ligandos Puros sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.**

| Tiempo de Incubación            | 24 Horas |      |     | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |
|---------------------------------|----------|------|-----|----------|------|------|----------|------|------|
|                                 | 100      | 10   | 1   | 100      | 10   | 1    | 100      | 10   | 1    |
| ANILINDITIOCARBAMATO DE POTASIO | 33.6     | 5.9  | 0   | 71.3     | 10.9 | 0    | 83.9     | 60.7 | 39.0 |
| ESTILAMFATO DE POTASIO          | 64.6     | 36.4 | 8.2 | 79.2     | 73.5 | 21.6 | 97.9     | 86.1 | 58.4 |

Tabla 26: Efecto de los derivados acridínicos sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.

| Tiempo de Incubación | 24 Horas              |      |      | 48 Horas |      |      | 72 Horas |      |      |     |
|----------------------|-----------------------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|-----|
|                      | Concentración (µg/ml) | 100  | 10   | 1        | 100  | 10   | 1        | 100  | 10   | 1   |
| BG-203               | 100                   | 100  | 70.0 | 100      | 100  | 93.4 | 100      | 100  | 100  | 100 |
| BG-237               | 100                   | 96.0 | 90.0 | 100      | 100  | 100  | 100      | 100  | 100  | 100 |
| BG-289               | 100                   | 100  | 30.0 | 100      | 100  | 88.2 | 100      | 100  | 100  | 100 |
| BG-314               | 100                   | 99.4 | 95.9 | 100      | 95.2 | 84.2 | 100      | 100  | 100  | 100 |
| BG-405               | 97.9                  | 54.8 | 15.3 | 100      | 51.9 | 48.1 | 100      | 75.3 | 73.0 |     |
| BG-444               | 28.2                  | 12.8 | 0    | 12.6     | 11.1 | 0    | 95.5     | 30.3 | 0    |     |
| BG-451               | 100                   | 81.5 | 0    | 100      | 100  | 22.2 | 100      | 99.1 | 20.2 |     |
| BG-460               | 97.5                  | 95.9 | 94.5 | 98.4     | 93.2 | 87.4 | 100      | 95.2 | 89.2 |     |
| BG-481               | 0                     | 0    | 0    | 23.6     | 10.1 | 0    | 38.5     | 12.8 | 0    |     |
| BG-493               | 99.5                  | 95.2 | 90.6 | 100      | 97.2 | 90.6 | 100      | 100  | 100  |     |
| BG-498               | 100                   | 100  | 100  | 100      | 100  | 100  | 100      | 100  | 100  |     |
| BG-506               | 96.9                  | 90.4 | 86.9 | 98.4     | 93.2 | 87.4 | 100      | 95.2 | 89.2 |     |
| BG-514               | 51.8                  | 25.1 | 0    | 72.6     | 0    | 0    | 99.6     | 41.6 | 0    |     |
| BG-515               | 51.7                  | 0    | 0    | 91.5     | 0    | 0    | 95.6     | 36.4 | 0    |     |
| BG-529               | 12.8                  | 0    | 0    | 0        | 0    | 0    | 0        | 0    | 0    |     |
| BG-530               | 0                     | 0    | 0    | 0        | 0    | 0    | 56.9     | 48.7 | 0    |     |
| BG-541               | 100                   | 100  | 0    | 100      | 100  | 50.8 | 100      | 100  | 100  |     |

### 3.L. Selección de los compuestos más efectivos para posteriores estudios.

En función del porcentaje de inhibición de crecimiento ejercido frente a las formas de ambos parásitos estudiadas, se seleccionaron los siguientes compuestos:

-Entre los complejos metálicos, se seleccionó el Rh(III) Ethylxantato, que ejerció un porcentaje de inhibición del crecimiento del 100% a las concentraciones de 100, 10 y 1  $\mu\text{g/ml}$  y a los tiempos ensayados.

Al objeto de comprobar el efecto comparativo ejercido por el ligando del complejo anterior, se ensayó la actividad del Ethylxantato de  $\text{K}^+$  frente a formas epimastigotas de *T. cruzi* (Tabla 12) y frente a formas promastigotas de *L. donovani* (Tabla 25).

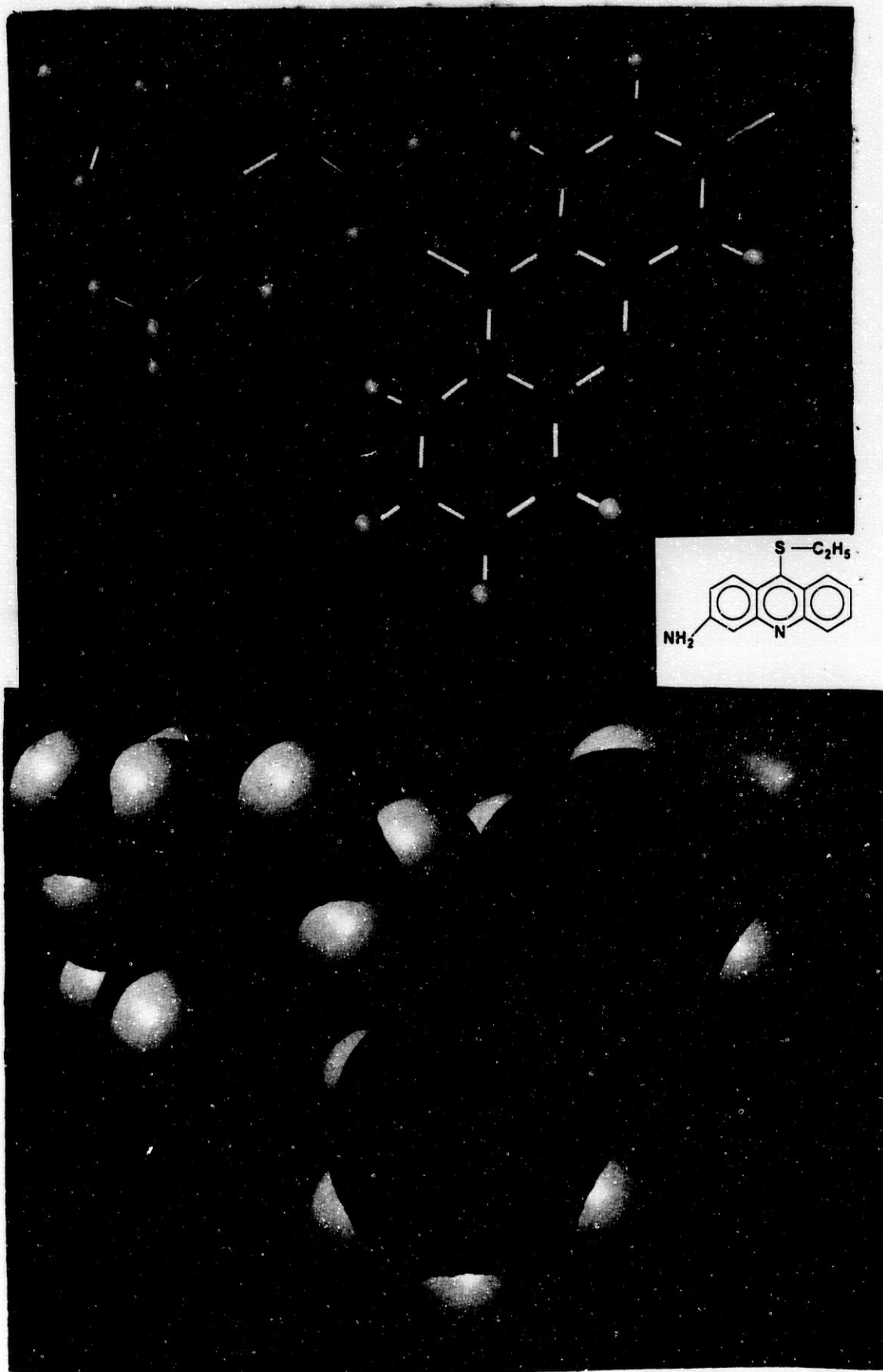
-Entre los derivados acridínicos se seleccionaron los compuestos BG-203, BG-237, BG-289, BG-314, BG-460, BG-498 y BG-541.

Al objeto de discriminar más entre estos derivados acridínicos se realizó un estudio de la alteración de la movilidad producida por estos compuestos a la concentración de 0.01  $\mu\text{g/ml}$ , y a las 24, 48 y 72 horas de interacción. En función de estos datos los tres compuestos más activos resultaron ser los siguientes: BG-203, BG-237 y BG-289.

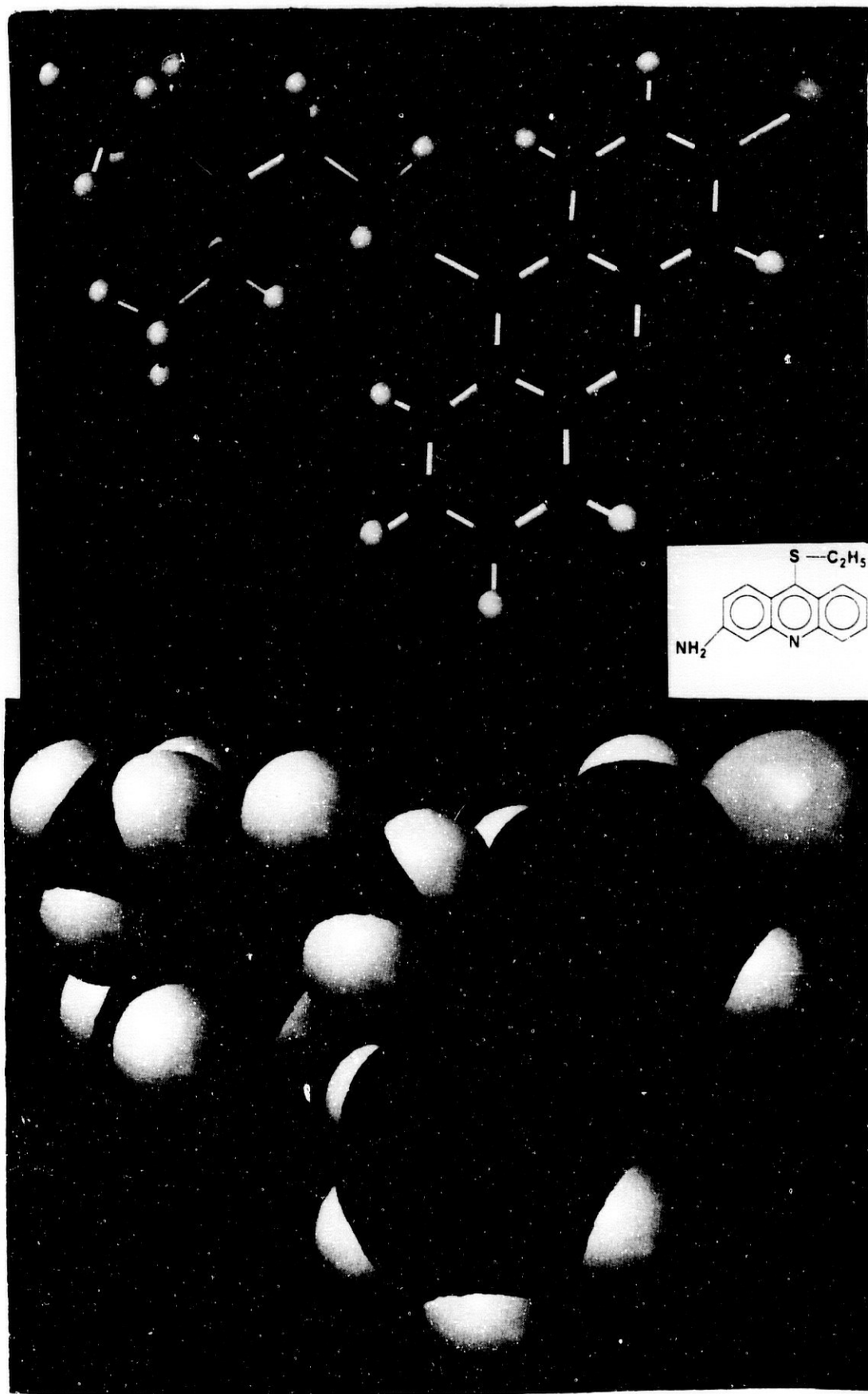
En función de lo indicado anteriormente, los compuestos seleccionados para continuar nuestros ensayos fueron los siguientes:

- RhIII Ethylxantato.
- Ethylxantato de  $\text{K}^+$ .
- BG-203.
- BG-237.
- BG-289.

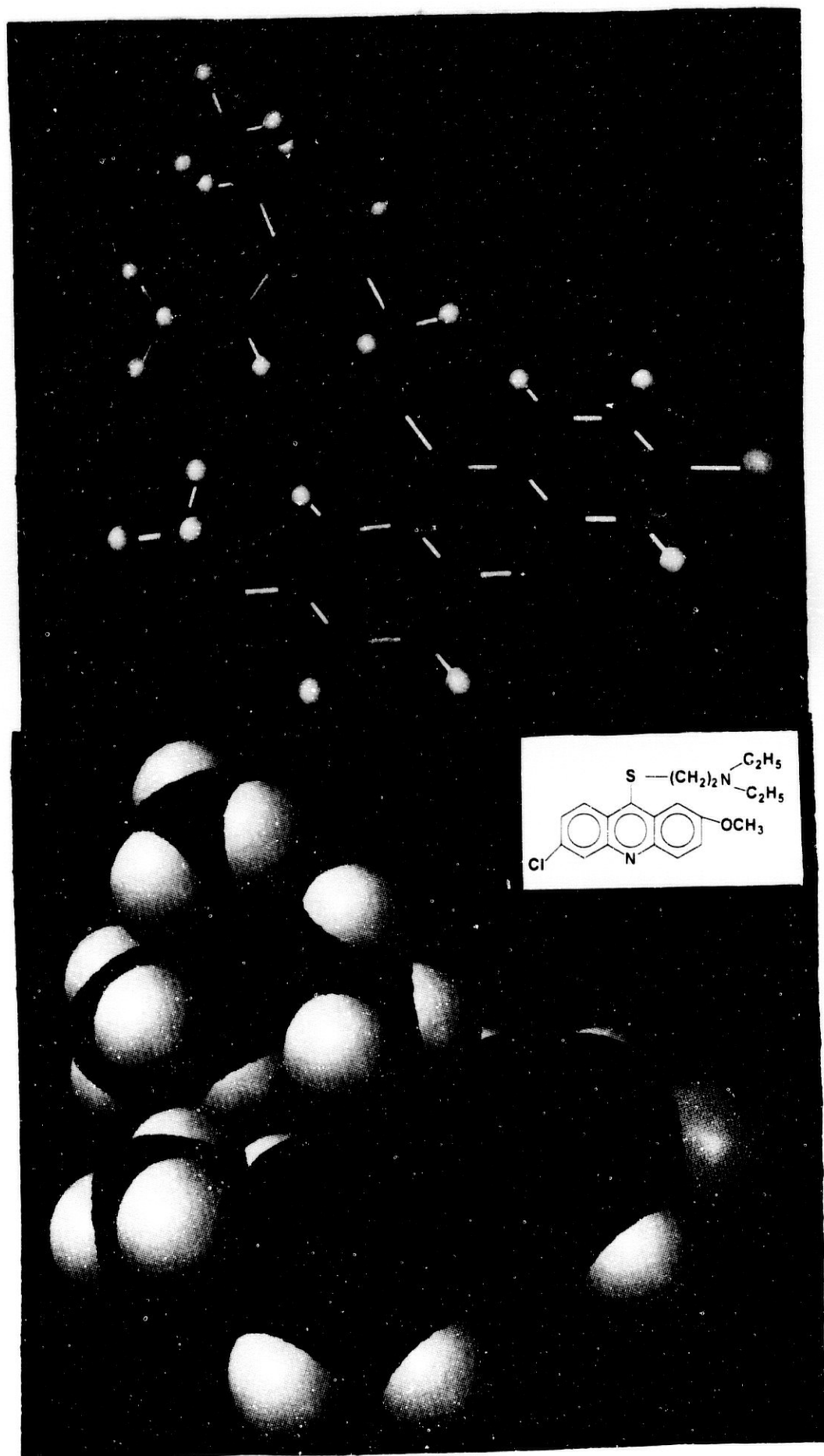




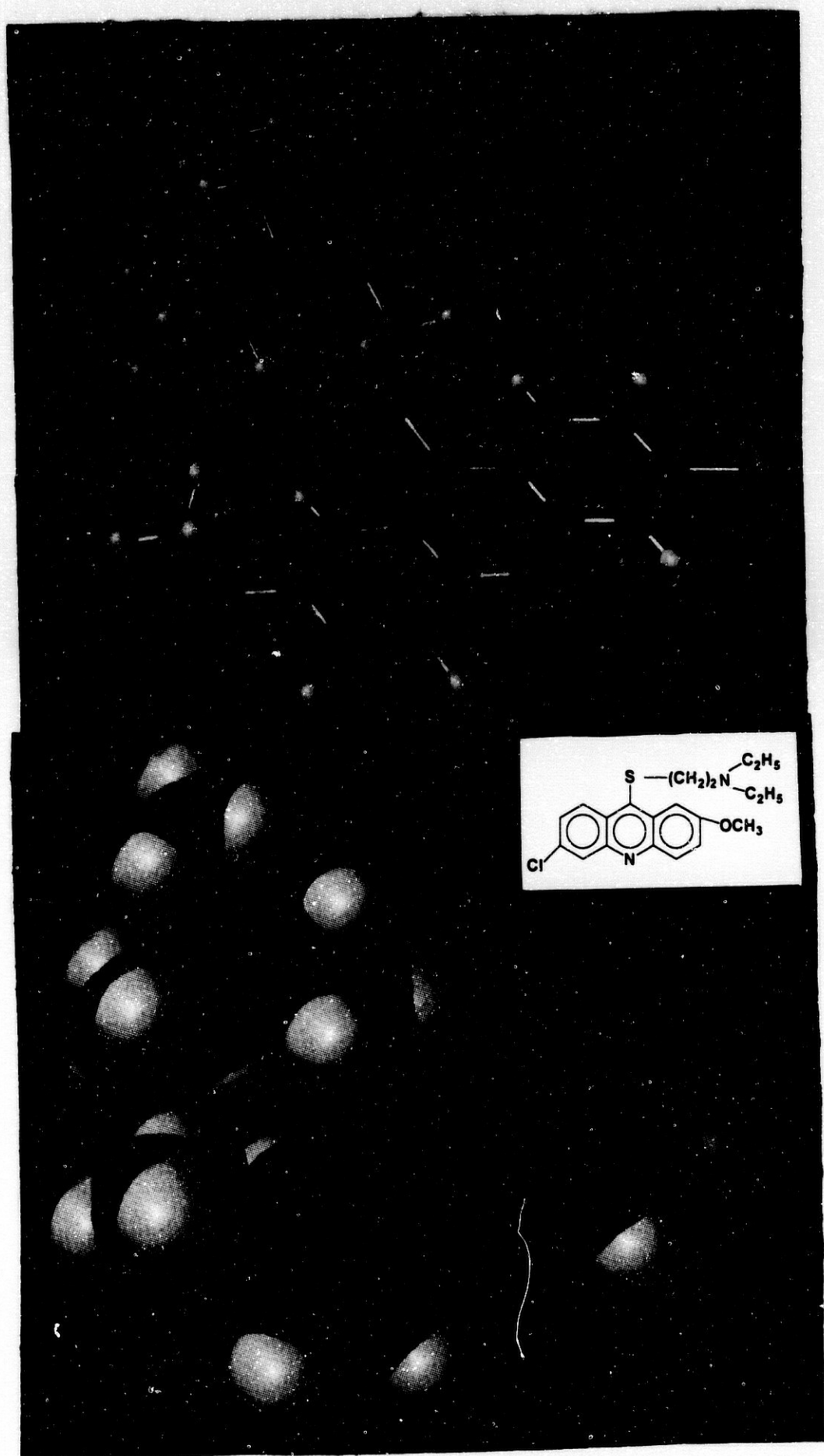
Tres conformaciones estructurales del derivado acridínico BG-203.



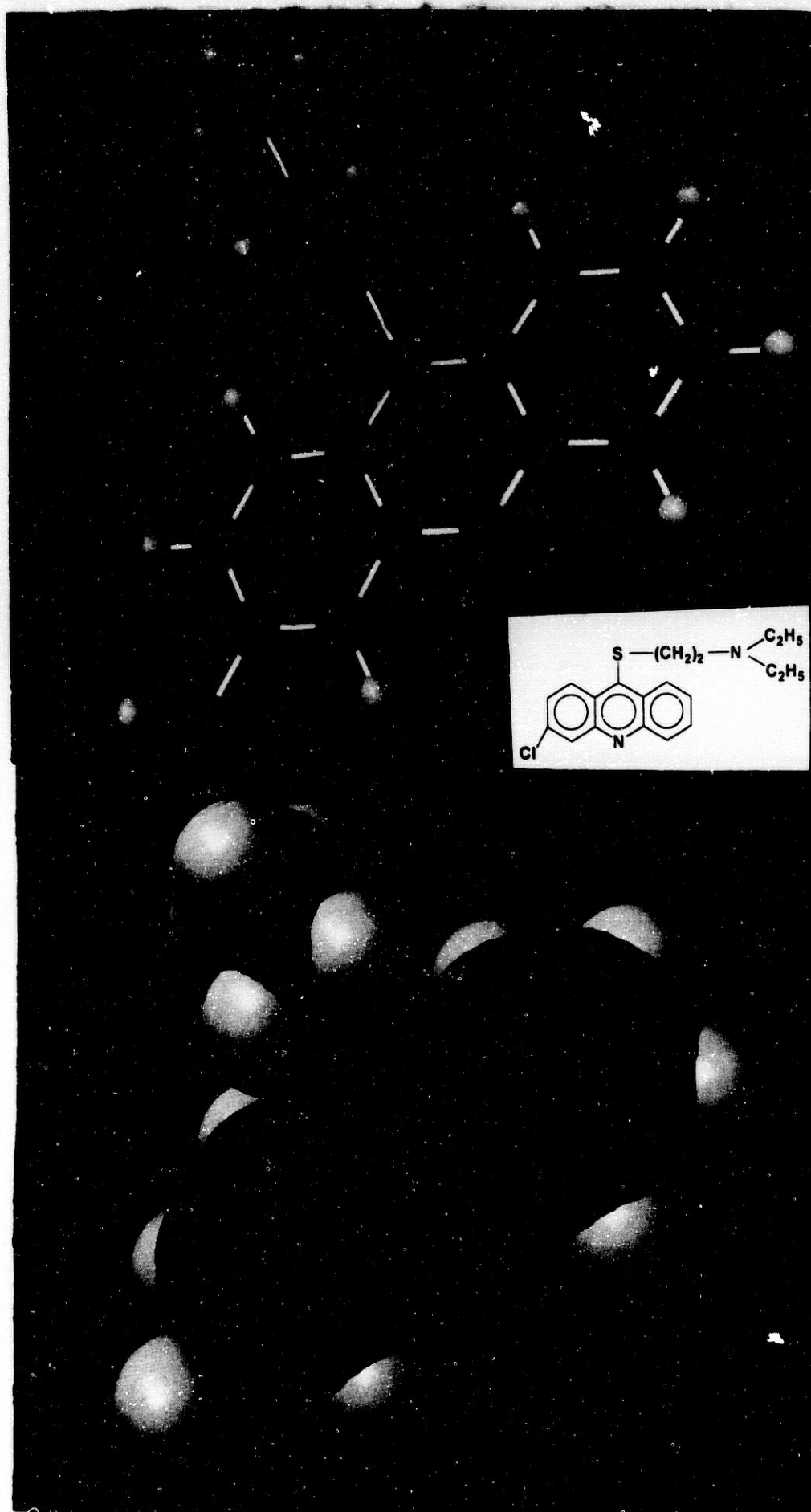
Tres conformaciones estructurales del derivado acridínico BG-203.



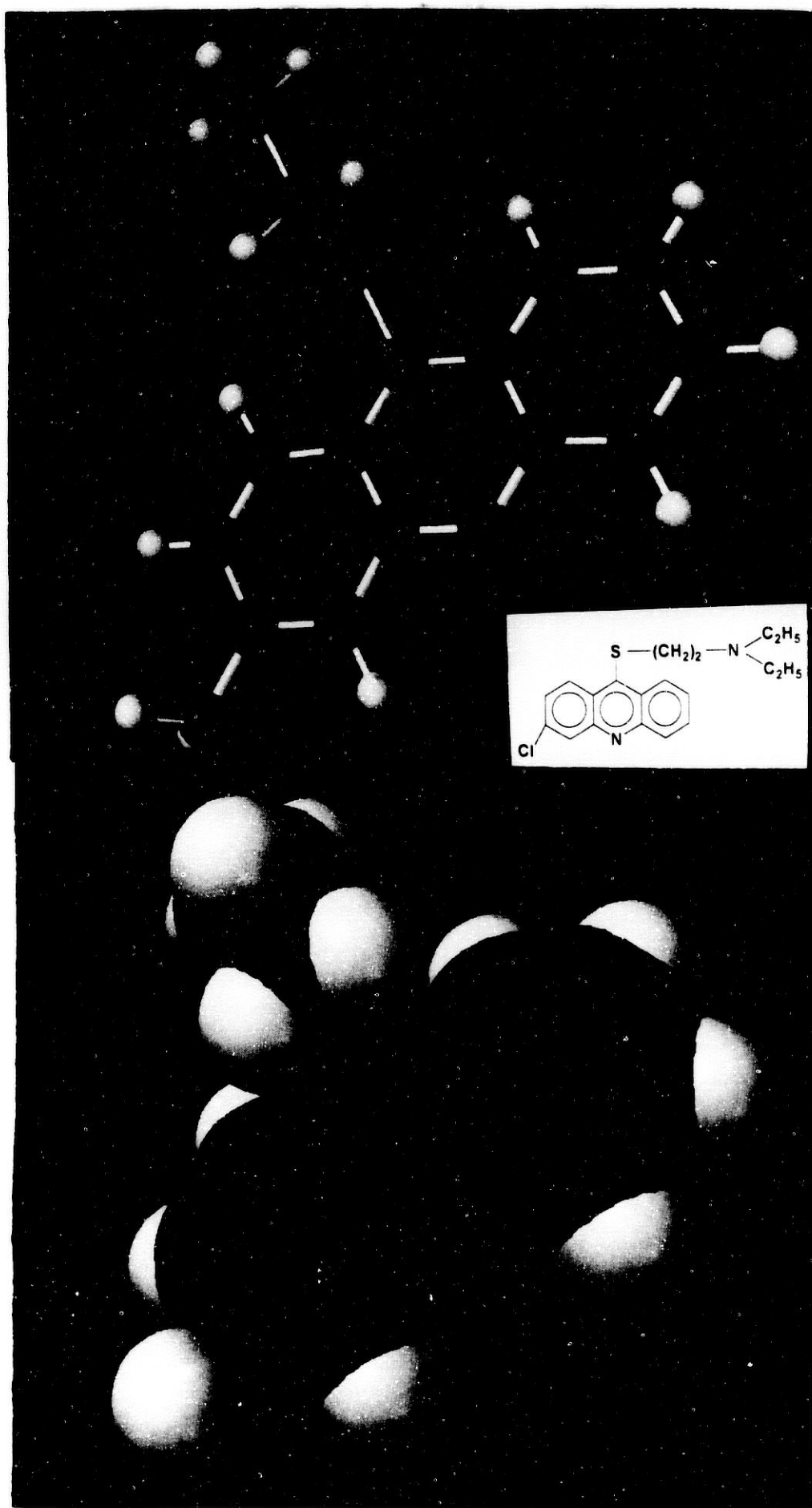
Tres conformaciones estructurales del derivado acridínico BG-237.



Tres conformaciones estructurales del derivado acridínico BG-237.



Tres conformaciones estructurales del derivado acridínico BG-289.



Tres conformaciones estructurales del derivado acridínico BG-289.

**3.LL.- Estudio del crecimiento en cultivo en presencia de los compuestos seleccionados; de las formas epimastigotas, metacíclicas y amastigotas de *T.cruzi*; y de las formas promastigotas y amastigotas de *L. donovani*.**

Las distintas formas de *T. cruzi* y de *L. donovani* cultivadas "in vitro", se sometieron a un estudio de la inhibición en el crecimiento que ejercían los compuestos seleccionados. Para ello se siguió el procedimiento indicado en el apartado 2.B.2.A.

En todos los casos las dosis utilizadas para los compuestos fueron de 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001  $\mu\text{g/ml}$ , y los tiempos de ensayo fueron de 24, 48 y 72 horas.

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 27 a 51.

Tabla 37: Efecto del complejo Rh(III)-Ethylxantato sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 100                  | 100  | 100  |
| 1                     | 100                  | 100  | 100  |
| 0.1                   | 27.4                 | 34.2 | 38.2 |
| 0.01                  | 3.9                  | 4.9  | 6.2  |
| 0.001                 | 0                    | 1.2  | 2.2  |



**Tabla 28: Efecto del complejo Rh(III)-Ethylxantato sobre formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*.**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 76.3                 | 100  | 100  |
| 10                    | 57.9                 | 76.8 | 81.4 |
| 1                     | 10.6                 | 21.3 | 27.9 |
| 0.1                   | 0                    | 2.2  | 7.7  |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 0    |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

**Tabla 29: Efecto del complejo Rh(III)-Ethylenato sobre el crecimiento de formas amastigotes de *Trypanosoma cruzi*, obtenidas "in vitro".**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 100                  | 100  | 100  |
| 1                     | 43.7                 | 61.4 | 67.3 |
| 0.1                   | 0                    | 4.2  | 5.7  |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 0    |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

**Tabla 30: Efecto del complejo Rh(III)-Ethylxantato sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 100                  | 100  | 100  |
| 1                     | 100                  | 100  | 100  |
| 0.1                   | 0                    | 9.2  | 10.7 |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 0    |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

Tabla 31: Efecto del complejo Rh(III)-Ethylenamato sobre el crecimiento de formas amastigotes de *Leishmania donovani*, obtenidas "in vitro".

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 43.2                 | 69.9 | 82.8 |
| 10                    | 34.5                 | 43.2 | 54.2 |
| 1                     | 17.1                 | 21.0 | 35.9 |
| 0.1                   | 0                    | 0    | 7.7  |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 6.9  |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

**Tabla 32: Efecto del ligando Ethylxantato de K' sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 47.5                 | 65.8 | 74.1 |
| 10                    | 39.2                 | 42.5 | 52.9 |
| 1                     | 0                    | 0    | 0    |
| 0.1                   | 0                    | 0    | 0    |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 0    |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

Tabla 33: Efecto del ligando Ethylxantato de K' sobre formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*.

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 73.1                 | 81.3 | 97.5 |
| 10                    | 41.2                 | 68.4 | 77.2 |
| 1                     | 3.0                  | 3.2  | 8.5  |
| 0.1                   | 0                    | 0.8  | 1.4  |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 0    |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

**Tabla 34: Efecto del ligando Ethylxantato de K<sup>+</sup> sobre el crecimiento de formas amastigotes de *Trypanosoma cruzi*, obtenidas "in vitro".**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 100                  | 100  | 100  |
| 1                     | 3.7                  | 7.3  | 9.1  |
| 0.1                   | 0                    | 0.2  | 5.7  |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 0    |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

**Tabla 35: Efecto del ligando Ethylxantato de K' sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 64.6                 | 79.2 | 97.9 |
| 10                    | 36.4                 | 73.5 | 86.1 |
| 1                     | 8.2                  | 21.6 | 58.4 |
| 0.1                   | 6.4                  | 11.6 | 12.8 |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 0    |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |



**Tabla 36: Efecto del ligando Ethylxantato de K' sobre el crecimiento de formas amastigotes de *Leishmania donovani*, obtenidas "in vitro".**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 44.6                 | 67.8 | 77.9 |
| 10                    | 26.4                 | 33.6 | 66.1 |
| 1                     | 9.2                  | 26.7 | 38.7 |
| 0.1                   | 5.6                  | 7.8  | 16.8 |
| 0.01                  | 3.4                  | 4.8  | 6.9  |
| 0.001                 | 0                    | 2.4  | 2.8  |

**Tabla 37: Efecto del derivado BG-203 sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 100                  | 100  | 100  |
| 1                     | 70                   | 93.4 | 100  |
| 0.1                   | 27.4                 | 34.2 | 38.2 |
| 0.01                  | 3.9                  | 4.9  | 6.2  |
| 0.001                 | 0                    | 1.2  | 2.2  |

**Tabla 38: Efecto del derivado Bg-203 sobre formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*.**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 71.5                 | 100  | 100  |
| 1                     | 58.9                 | 76.2 | 100  |
| 0.1                   | 6.4                  | 10.8 | 11.3 |
| 0.01                  | 0                    | 3.7  | 4.8  |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

Tabla 39: Efecto del derivado BG-203 sobre el crecimiento de formas amastigotes de *Trypanosoma cruzi*, obtenidas "in vitro".

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 71.5                 | 100  | 100  |
| 1                     | 58.9                 | 76.2 | 100  |
| 0.1                   | 6.4                  | 10.8 | 11.3 |
| 0.01                  | 0                    | 3.7  | 4.8  |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

**Tabla 40: Efecto del derivado BG-203 sobre el crecimiento de formas promastigotas de *Leishmania donovani*.**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 100                  | 100  | 100  |
| 1                     | 70                   | 93.4 | 100  |
| 0.1                   | 27.4                 | 34.2 | 38.2 |
| 0.01                  | 3.9                  | 4.9  | 6.2  |
| 0.001                 | 0                    | 1.2  | 2.7  |

**Tabla 41: Efecto del derivado BG-203 sobre el crecimiento de formas amastigotes de *Leishmania donovani*, obtenidas "in vitro".**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 76.2                 | 100  | 100  |
| 1                     | 47.9                 | 76.2 | 84.9 |
| 0.1                   | 0                    | 4.2  | 7.3  |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 0    |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

**Tabla 42: Efecto del derivado DG-237 sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 100                  | 100  | 100  |
| 1                     | 0                    | 10.2 | 100  |
| 0.1                   | 0                    | 0    | 9.2  |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 3.9  |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

Tabla 43: Efecto del derivado BG-237 sobre formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*.

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 100                  | 100  | 100  |
| 1                     | 53.2                 | 84.2 | 100  |
| 0.1                   | 0                    | 10.4 | 15.6 |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 4.3  |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 1.7  |



**Tabla 44: Efecto del derivado BG-237 sobre el crecimiento de formas amastigotes de *Trypanosoma cruzi*, obtenidas "in vitro".**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 87.4                 | 91.2 | 100  |
| 10                    | 53.7                 | 66.9 | 69.8 |
| 1                     | 0                    | 10.2 | 16.3 |
| 0.1                   | 0                    | 0    | 6.9  |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 1.9  |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

Tabla 45: Efecto del derivado BG-237 sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 96.0                 | 100  | 100  |
| 1                     | 90.0                 | 100  | 100  |
| 0.1                   | 56.2                 | 63.4 | 67.4 |
| 0.01                  | 17.1                 | 19.2 | 19.2 |
| 0.001                 | 3.2                  | 3.2  | 4.2  |

Tabla 46: Efecto del derivado BG-237 sobre el crecimiento de formas amastigotes de *Leishmania donovani*.

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 71.0                 | 76.2 | 83.2 |
| 1                     | 50.9                 | 67.2 | 81.3 |
| 0.1                   | 34.7                 | 41.4 | 43.2 |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 0    |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

Tabla 47: Efecto del derivado BG-289 sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 100                  | 100  | 100  |
| 1                     | 100                  | 100  | 100  |
| 0.1                   | 0                    | 6.7  | 9.2  |
| 0.01                  | 0                    | 1.2  | 3.9  |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

**Tabla 48: Efecto del derivado BG-289 sobre formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*.**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 89.2                 | 100  | 100  |
| 10                    | 47.3                 | 59.6 | 84.2 |
| 1                     | 0                    | 20.3 | 53.1 |
| 0.1                   | 0                    | 0    | 7.9  |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 0    |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

Tabla 49: Efecto del derivado BG-289 sobre el crecimiento de formas amastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 70.9                 | 73.7 | 92.8 |
| 10                    | 34.4                 | 51.4 | 72.1 |
| 1                     | 10.4                 | 21.2 | 33.3 |
| 0.1                   | 0                    | 0.7  | 2.7  |
| 0.01                  | 0                    | 0    | 0    |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 0    |

**Tabla 50: Efecto del derivado BG-289 sobre el crecimiento de formas promastigotes de *Leishmania donovani*.**

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 100                  | 100  | 100  |
| 1                     | 30.0                 | 88.2 | 100  |
| 0.1                   | 13.2                 | 19.2 | 23.1 |
| 0.01                  | 0.5                  | 3.4  | 3.6  |
| 0.001                 | 0                    | 0.3  | 0.5  |

Tabla 51: Efecto del derivado BG-289 sobre el crecimiento de formas amastigotes de *Leishmania donovani*.

| Concentración (µg/ml) | Tiempo de Incubación |      |      |
|-----------------------|----------------------|------|------|
|                       | 24 h                 | 48 h | 72 h |
| 100                   | 100                  | 100  | 100  |
| 10                    | 100                  | 100  | 100  |
| 1                     | 47.5                 | 58.9 | 93.2 |
| 0.1                   | 7.4                  | 11.9 | 14.9 |
| 0.01                  | 2.9                  | 4.2  | 4.7  |
| 0.001                 | 0                    | 0    | 3.1  |



**3.M.- Influencia de los compuestos seleccionados sobre la incorporación de precursores radiactivos en formas epimastigotas de *T. cruzi* y promastigotas de *L. donovani*.**

Se siguió el procedimiento indicado en el apartado 2.B.2.B.7., estudiándose la acción de los compuestos sobre los niveles de incorporación de Timidina [ $^3\text{H}$ ], Uridina [ $^3\text{H}$ ] y Leucina [ $^3\text{H}$ ] en las formas ya indicadas de ambos parásitos.

Los resultados se muestran en las Tablas 52 a 61.

... con un control del complejo RhIII-Etilxantato sobre la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-Timidina, [ $^3\text{H}$ ]-Leucina y [ $^3\text{H}$ ]-Uridina en formas promastigotas de *T. cruzi*, expresado en CPM.

| Precursor |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Tiempo    | Timidina |          |          | Uridina  |          |          | Leucina  |          |          |
|           | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml |
| 0         | 2280±64  | 2280± 64 | 2280±64  | 494± 22  | 494± 22  | 494± 22  | 2423±121 | 2423±121 | 2423±121 |
| 45        | 5218±71  | 3718± 72 | 4254±93  | 816± 9   | 647± 12  | 761± 55  | 5631±104 | 4941±132 | 5167± 97 |
| 90        | 9871±98  | 6521± 88 | 6941±98  | 1348± 97 | 1100±105 | 1123± 64 | 8935±187 | 5111±190 | 5618± 43 |
| 135       | 12321±55 | 7325±114 | 7481±82  | 1594± 65 | 1073± 98 | 1094± 55 | 13247±77 | 5891± 67 | 6141±103 |

Tabla 53: Efecto del complejo RhIII-Etilxantato sobre la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-Timidina, [ $^3\text{H}$ ]-Leucina y [ $^3\text{H}$ ]-Uridina en formas promastigotas de *L. donevani*, expresado en CPM.

| Precursor |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Tiempo    | Timidina |          |          | Uridina  |          |          | Leucina  |          |          |
|           | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml |
| 0         | 1348±13  | 1348± 53 | 1348±53  | 1618±167 | 1618±167 | 1618±167 | 959± 63  | 959± 63  | 959± 63  |
| 45        | 2415±71  | 1491±108 | 1659±74  | 2189± 6  | 1719± 9  | 2023± 18 | 1521± 46 | 984± 21  | 1082± 76 |
| 90        | 3841±56  | 1751± 67 | 1829±98  | 3742± 69 | 2223±122 | 2682± 51 | 2494± 60 | 1143±165 | 1486± 55 |
| 135       | 4351±98  | 1843± 94 | 2093±82  | 4618±143 | 2447± 54 | 2734± 98 | 3104± 65 | 1491± 29 | 1741± 77 |

Tabla 54: Efecto del ligando Etilxantato de K<sup>+</sup> sobre la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-Timidina, [ $^3\text{H}$ ]-Leucina y [ $^3\text{H}$ ]-Uridina en formas epimastigotas de *T. cruzi*, expresado en CPM.

| Precursor |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Tiempo    | Timidina |          |          | Uridina  |          |          | Leucina  |          |          |
|           | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml |
| 0         | 2900±44  | 2900± 44 | 2900±44  | 430± 86  | 430± 86  | 430± 86  | 2500± 32 | 2500± 32 | 2500± 32 |
| 45        | 7320±25  | 6354± 12 | 6895±12  | 960±112  | 796± 55  | 884± 97  | 8418± 65 | 6221± 76 | 7141±103 |
| 90        | 9864±22  | 6821± 43 | 6997±11  | 1274± 75 | 897± 76  | 941± 76  | 10741±99 | 6941± 54 | 7818±121 |
| 135       | 13871±73 | 8834± 22 | 9174±15  | 1618± 43 | 983± 32  | 1141± 44 | 13643±76 | 7141±102 | 8141± 43 |

Tabla 55: Efecto del ligando Etilxantato de K<sup>+</sup> sobre la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-Timidina, [ $^3\text{H}$ ]-Leucina y [ $^3\text{H}$ ]-Uridina en formas promastigotas de *L. donevani*, expresado en CPM.

| Precursor |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Tiempo    | Timidina |          |          | Uridina  |          |          | Leucina  |          |          |
|           | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml |
| 0         | 1184±83  | 1184± 83 | 1184±83  | 1241± 55 | 1241± 55 | 1241± 55 | 1051± 72 | 1051± 72 | 1051± 72 |
| 45        | 1614±21  | 1198± 43 | 1370±87  | 1981± 26 | 1640± 12 | 1896± 33 | 1241± 9  | 1086± 21 | 1184± 36 |
| 90        | 2241±56  | 1523± 10 | 1718±43  | 3481±122 | 2430±165 | 2846± 66 | 1443± 62 | 1273± 43 | 1348± 75 |
| 135       | 3358±21  | 2074± 76 | 2441±64  | 4318± 55 | 2866± 21 | 3108± 9  | 1984± 13 | 1451± 33 | 1681± 92 |

Tabla 36: Efecto del derivado acridínico BG-203 sobre la incorporación de ( $^3\text{H}$ )-Timidina, ( $^3\text{H}$ )-Leucina y ( $^3\text{H}$ )-Uridina en formas epimastigotas de *T. cruzi*, expresado en CPM.

| Precursor |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Tiempo    | Timidina |          |          | Uridina  |          |          | Leucina  |          |          |
|           | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml |
| 0         | 3141±88  | 3141± 88 | 3141±88  | 1128± 22 | 1128± 22 | 1128± 22 | 976± 33  | 976± 33  | 976± 33  |
| 45        | 6571±222 | 4086±115 | 4875±66  | 1676±105 | 1455± 85 | 1534± 32 | 1743±105 | 1506± 29 | 1643± 39 |
| 90        | 10947±99 | 5921±112 | 7501±15  | 3346± 89 | 2253± 96 | 2767± 55 | 4182±115 | 3389± 25 | 3848± 2  |
| 135       | 13849±56 | 5992±22  | 7880±54  | 4918± 32 | 2792±116 | 3630± 25 | 6641± 54 | 5081± 44 | 6014± 94 |

Tabla 37: Efecto del derivado acridínico BG-203 sobre la incorporación de ( $^3\text{H}$ )-Timidina, ( $^3\text{H}$ )-Leucina y ( $^3\text{H}$ )-Uridina en formas promastigotas de *L. donovani*, expresado en CPM.

| Precursor |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Tiempo    | Timidina |          |          | Uridina  |          |          | Leucina  |          |          |
|           | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml |
| 0         | 2798±68  | 2798± 68 | 2798±68  | 683± 13  | 683± 13  | 683± 13  | 859±114  | 859±114  | 859±114  |
| 45        | 4349±13  | 3898± 22 | 4036±55  | 963± 6   | 807± 77  | 862± 56  | 1967± 76 | 1617± 77 | 1791± 21 |
| 90        | 10518±76 | 8531± 55 | 8606±29  | 1202± 76 | 848± 33  | 981±112  | 3049± 27 | 2296±162 | 2708±115 |
| 135       | 14359±21 | 11959±82 | 12444± 9 | 1800±121 | 1117± 76 | 1378± 66 | 6968± 87 | 5890±112 | 4570± 66 |

Tabla 38: Efecto del derivado acridínico BG-237 sobre la incorporación de ( $^3\text{H}$ )-Timidina, ( $^3\text{H}$ )-Leucina y ( $^3\text{H}$ )-Uridina en formas epimastigotas de *T. cruzi*, expresado en CPM.

| Precursor |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Tiempo    | Timidina |          |          | Uridina  |          |          | Leucina  |          |          |
|           | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml |
| 0         | 5081±15  | 5081± 15 | 5081±15  | 997± 44  | 997± 44  | 997± 44  | 1381± 72 | 1381± 72 | 1381± 72 |
| 45        | 8413±27  | 5623± 77 | 6380±48  | 1541±144 | 1134±187 | 1261±110 | 2496± 88 | 2496±114 | 2496± 52 |
| 90        | 12140±53 | 5807±116 | 7978±33  | 2821± 26 | 1857± 52 | 2082±188 | 5141± 22 | 3537±107 | 3795± 7  |
| 135       | 17216±20 | 5546±75  | 8744±12  | 4122±144 | 2266±122 | 2753± 33 | 6789±147 | 4113± 22 | 4787± 44 |

Tabla 39: Efecto del derivado acridínico BG-237 sobre la incorporación de ( $^3\text{H}$ )-Timidina, ( $^3\text{H}$ )-Leucina y ( $^3\text{H}$ )-Uridina en formas promastigotas de *L. donovani*, expresado en CPM.

| Precursor |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Tiempo    | Timidina |          |          | Uridina  |          |          | Leucina  |          |          |
|           | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml |
| 0         | 4356±45  | 4356± 45 | 4356±45  | 746± 17  | 746± 16  | 746± 16  | 1941± 54 | 1941± 54 | 1941± 54 |
| 45        | 7864±22  | 4958±110 | 5632±22  | 1216± 33 | 804± 75  | 958± 51  | 2647±184 | 1994± 42 | 2221± 84 |
| 90        | 9846±22  | 5137± 11 | 6834±52  | 1938± 76 | 1190± 14 | 1479± 9  | 4489± 19 | 3295± 66 | 3521± 15 |
| 135       | 16341±54 | 5928±47  | 7680±14  | 2143± 55 | 1258±148 | 1552±158 | 5941± 21 | 3911±116 | 4349± 11 |

Tabla 60: Efecto del derivado acridínico BG-289 sobre la incorporación de ( $^3\text{H}$ )-Timidina, ( $^3\text{H}$ )-Leucina y ( $^3\text{H}$ )-Uridina en formas epimastigotas de *T. cruzi*, expresado en CPM.

| Precursor |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Tiempo    | Timidina |          |          | Uridina  |          |          | Leucina  |          |          |
|           | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml |
| 0         | 4821±88  | 4821± 88 | 4821±88  | 1908±156 | 1908±156 | 1908±156 | 1043± 24 | 1043± 24 | 1043± 24 |
| 45        | 7631±22  | 6041± 54 | 6854±22  | 2461±118 | 2020± 87 | 2081± 55 | 1481± 45 | 1297± 52 | 1369±142 |
| 90        | 12841±47 | 7871± 52 | 9584±22  | 3143±114 | 2138± 77 | 2247± 95 | 1796± 36 | 1523±188 | 1609± 66 |
| 135       | 17814±98 | 8894±52  | 11341±52 | 4384±125 | 2578± 78 | 2788± 16 | 2114± 58 | 1666±154 | 1799± 55 |

Tabla 61: Efecto del derivado acridínico BG-289 sobre la incorporación de ( $^3\text{H}$ )-Timidina, ( $^3\text{H}$ )-Leucina y ( $^3\text{H}$ )-Uridina en formas promastigotas de *L. donovani*, expresado en CPM.

| Precursor |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Tiempo    | Timidina |          |          | Uridina  |          |          | Leucina  |          |          |
|           | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml | Control  | 100µg/ml | 50 µg/ml |
| 0         | 5479±30  | 5479± 30 | 5479±30  | 1609±114 | 1609±114 | 1609±114 | 947± 71  | 947± 71  | 947± 71  |
| 45        | 8611±98  | 5423± 15 | 8513±71  | 1898± 44 | 1399± 21 | 1412± 63 | 1118±114 | 770± 42  | 963±155  |
| 90        | 13155±11 | 6090± 44 | 12730±38 | 2314±117 | 1288± 42 | 1217± 6  | 1648± 44 | 721±114  | 1211± 33 |
| 135       | 19196±51 | 6191±186 | 18196±47 | 3557± 15 | 1192± 92 | 1766±101 | 1511± 77 | 626± 64  | 1409±154 |

**3.N. Acción de los compuestos seleccionados sobre cultivos no infectados de células HeLa y Vero, y de macrófagos J-774A.1 y RAW.264.7.**

Al objeto de conocer la susceptibilidad de estas células a diferentes concentraciones y tiempos de actuación, se realizaron experiencias en periodos de 6, 9 y 12 horas a 100, 10 y 1  $\mu\text{g/ml}$ . El procedimiento seguido es el indicado en el apartado 2.B.2.B.

Los resultados obtenidos son el resultado de cuatro ensayos experimentales, habiéndose observado en cada ensayo un mínimo de 30 campos de cada cultivo. Estos resultados aparecen en las Tablas 62 a 71, y vienen expresados en porcentaje de mortalidad celular.

Tabla 62: acción del complejo Rh<sup>III</sup>-Ethyloxantato sobre células HeLa y Vero no parasitadas.

| tiempo (h) | HeLa                  |       |      | Vero                  |       |      |
|------------|-----------------------|-------|------|-----------------------|-------|------|
|            | Concentración (µg/ml) |       |      | Concentración (µg/ml) |       |      |
|            | 100                   | 10    | 1    | 100                   | 10    | 1    |
| 6          | 13.10                 | 4.27  | 1.11 | 13.17                 | 6.33  | 0.00 |
| 9          | 24.56                 | 13.88 | 1.34 | 25.56                 | 6.98  | 0.00 |
| 12         | 26.77                 | 13.14 | 2.98 | 29.56                 | 11.87 | 1.22 |

Tabla 63: acción del complejo Rh<sup>III</sup>-Ethyloxantato sobre macrófagos J-774 y RAW no parasitados.

| tiempo (h) | J-774                 |       |       | RAW                   |       |       |
|------------|-----------------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
|            | Concentración (µg/ml) |       |       | Concentración (µg/ml) |       |       |
|            | 100                   | 10    | 1     | 100                   | 10    | 1     |
| 6          | 24.41                 | 6.33  | 5.00  | 22.18                 | 3.09  | 2.22  |
| 9          | 34.17                 | 28.99 | 7.17  | 29.22                 | 27.43 | 8.97  |
| 12         | 34.98                 | 32.16 | 13.33 | 33.56                 | 30.00 | 11.34 |

Tabla 64: acción del ligando Ethyloxantato de K<sup>+</sup> sobre células HeLa y Vero no parasitadas.

| tiempo (h) | HeLa                  |       |      | Vero                  |       |      |
|------------|-----------------------|-------|------|-----------------------|-------|------|
|            | Concentración (µg/ml) |       |      | Concentración (µg/ml) |       |      |
|            | 100                   | 10    | 1    | 100                   | 10    | 1    |
| 6          | 16.33                 | 6.88  | 3.99 | 15.21                 | 7.78  | 2.09 |
| 9          | 27.76                 | 17.90 | 6.88 | 25.44                 | 10.99 | 3.76 |
| 12         | 32.16                 | 27.97 | 7.56 | 29.18                 | 28.98 | 9.55 |

Tabla 65: acción del ligando Ethyloxantato de K<sup>+</sup> sobre macrófagos J-774 y RAW no parasitados.

| tiempo (h) | J-774                 |       |       | RAW                   |       |       |
|------------|-----------------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
|            | Concentración (µg/ml) |       |       | Concentración (µg/ml) |       |       |
|            | 100                   | 10    | 1     | 100                   | 10    | 1     |
| 6          | 27.21                 | 10.66 | 5.43  | 23.87                 | 8.09  | 6.87  |
| 9          | 32.76                 | 28.19 | 12.17 | 29.54                 | 26.15 | 8.90  |
| 12         | 38.98                 | 35.15 | 17.98 | 39.00                 | 31.00 | 19.87 |

Tabla 66: acción de la acridina BG-203 sobre células HeLa y Vero no parasitadas.

| tiempo (h) | HeLa                  |       |      | Vero                  |      |      |
|------------|-----------------------|-------|------|-----------------------|------|------|
|            | Concentración (µg/ml) |       |      | Concentración (µg/ml) |      |      |
|            | 100                   | 10    | 1    | 100                   | 10   | 1    |
| 6          | 17.18                 | 6.27  | 0.00 | 13.17                 | 4.17 | 0.00 |
| 9          | 19.21                 | 10.18 | 0.17 | 19.07                 | 7.15 | 0.00 |
| 12         | 25.16                 | 13.41 | 3.41 | 19.27                 | 9.27 | 0.51 |

Tabla 67: acción de la acridina BG-203 sobre macrófagos J-774 y RAW no parasitados.

| tiempo (h) | J-774                 |       |       | RAW                   |       |      |
|------------|-----------------------|-------|-------|-----------------------|-------|------|
|            | Concentración (µg/ml) |       |       | Concentración (µg/ml) |       |      |
|            | 100                   | 10    | 1     | 100                   | 10    | 1    |
| 6          | 28.41                 | 10.17 | 35.00 | 6.47                  | 0.00  | 0.00 |
| 9          | 36.17                 | 16.15 | 6.17  | 29.41                 | 10.27 | 3.17 |
| 12         | 49.61                 | 21.30 | 10.10 | 33.07                 | 20.41 | 7.15 |

Tabla 68: acción de la acridina BG-237 sobre células HeLa y Vero no parasitadas.

| tiempo (h) | HeLa                  |       |      | Vero                  |       |      |
|------------|-----------------------|-------|------|-----------------------|-------|------|
|            | Concentración (µg/ml) |       |      | Concentración (µg/ml) |       |      |
|            | 100                   | 10    | 1    | 100                   | 10    | 1    |
| 6          | 12.14                 | 10.18 | 6.17 | 10.91                 | 8.41  | 2.37 |
| 9          | 13.07                 | 10.21 | 6.18 | 16.17                 | 13.15 | 7.41 |
| 12         | 15.47                 | 17.18 | 7.21 | 19.15                 | 19.01 | 9.27 |

Tabla 69: acción de la acridina BG-237 sobre macrófagos J-774 y RAW no parasitados.

| tiempo (h) | J-774                 |       |       | RAW                   |       |       |
|------------|-----------------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
|            | Concentración (µg/ml) |       |       | Concentración (µg/ml) |       |       |
|            | 100                   | 10    | 1     | 100                   | 10    | 1     |
| 6          | 33.18                 | 24.25 | 9.41  | 29.16                 | 27.18 | 7.15  |
| 9          | 49.21                 | 31.16 | 12.16 | 38.21                 | 29.41 | 10.41 |
| 12         | 57.18                 | 38.27 | 13.29 | 47.16                 | 32.16 | 11.15 |

Tabla 70: acción de la acridina BG-289 sobre células HeLa y Vero no parasitadas.

| tiempo (h) | HeLa                  |       |      | Vero                  |       |      |
|------------|-----------------------|-------|------|-----------------------|-------|------|
|            | Concentración (µg/ml) |       |      | Concentración (µg/ml) |       |      |
|            | 100                   | 10    | 1    | 100                   | 10    | 1    |
| 6          | 9.27                  | 5.01  | 3.84 | 10.47                 | 4.16  | 0    |
| 9          | 13.08                 | 5.27  | 4.16 | 16.13                 | 7.21  | 2.91 |
| 12         | 16.21                 | 10.41 | 7.16 | 16.94                 | 13.84 | 7.58 |

Tabla 71: acción de la acridina BG-289 sobre macrófagos J-774 y RAW no parasitados.

| tiempo (h) | J-774                 |       |   | RAW                   |       |   |
|------------|-----------------------|-------|---|-----------------------|-------|---|
|            | Concentración (µg/ml) |       |   | Concentración (µg/ml) |       |   |
|            | 100                   | 10    | 1 | 100                   | 10    | 1 |
| 6          | 18.41                 | 7.41  | 0 | 10.27                 | 6.17  | 0 |
| 9          | 26.27                 | 8.94  | 0 | 31.14                 | 9.17  | 0 |
| 12         | 30.07                 | 10.30 | 0 | 36.91                 | 15.16 | 0 |



**3.Ñ. Acción de los compuestos seleccionados sobre macrófagos J-774A.1 infectados por formas promastigotas de *L. donovani*; y sobre células HeLa infectadas por formas metacíclicas de *T. cruzi*.**

Estas experiencias se realizaron a fin de conocer el posible efecto de los compuestos sobre las formas amastigotes intracelulares.

Se siguió el procedimiento indicado en el apartado 2.B.2.B.4.

Los resultados obtenidos a las 24, 48 y 72 horas postinfección, representan la media de 5 ensayos experimentales e indican el porcentaje de células parasitadas así como el índice de infección (número de parásitos/célula), existentes en 500 células elegidas al azar de cada uno de los lotes experimentales utilizados. A los datos se les realizó un tratamiento estadístico, consistente en un análisis de proporciones y en un T-test de Student.

Los resultados se muestran en las Tablas 72 a 81.

Tabla 72: Acción del complejo Rh<sup>III</sup>- Stilizantato sobre células HeLa parasitadas con *Trypanosoma cruzi*.

[Valor medio ± S.E.M. \*\* p<0.01; \* p<0.05].

| Dosis (µg/ml) | Horas post-infección. |               |              |               |              |               |
|---------------|-----------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
|               | 24 h.                 |               | 48 h.        |               | 72 h.        |               |
|               | SP                    | Ii            | SP           | Ii            | SP           | Ii            |
| Control       | 23.41 ± 1.10          | 1.52 ± 0.03   | 18.18 ± 2.21 | 2.26 ± 0.17   | 15.19 ± 1.67 | 6.94 ± 0.41   |
| 10            | 16.21 ± 0.81          | 1.01 ± 0.17** | 15.18 ± 1.91 | 1.42 ± 0.17** | 11.16 ± 1.91 | 2.01 ± 0.16** |
| 1             | 19.51 ± 0.31          | 1.28 ± 0.04** | 15.49 ± 1.31 | 1.54 ± 0.03** | 12.41 ± 1.32 | 3.01 ± 0.19** |
| 0.5           | 20.18 ± 0.18          | 1.27 ± 0.01** | 17.16 ± 1.81 | 2.02 ± 0.33** | 12.94 ± 1.61 | 4.30 ± 0.39** |

Tabla 73: Acción del ligando Stilizantato de Potasio sobre células HeLa parasitadas con *Trypanosoma cruzi*.

[Valor medio ± S.E.M. \*\* p<0.01; \* p<0.05].

| Dosis (µg/ml) | Horas post-infección. |               |              |               |              |               |
|---------------|-----------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
|               | 24 h.                 |               | 48 h.        |               | 72 h.        |               |
|               | SP                    | Ii            | SP           | Ii            | SP           | Ii            |
| Control       | 23.41 ± 1.10          | 1.52 ± 0.03   | 18.18 ± 2.21 | 2.26 ± 0.17   | 15.19 ± 1.67 | 6.94 ± 0.41   |
| 10            | 18.43 ± 2.39          | 1.30 ± 0.17** | 16.21 ± 1.38 | 1.04 ± 0.32** | 12.41 ± 0.82 | 2.03 ± 0.32** |
| 1             | 21.42 ± 1.71          | 1.41 ± 0.17** | 16.43 ± 1.22 | 2.06 ± 0.41** | 13.22 ± 2.19 | 3.18 ± 0.57** |
| 0.5           | 21.51 ± 1.27          | 1.47 ± 0.09** | 18.17 ± 0.53 | 2.20 ± 0.38   | 15.04 ± 1.21 | 3.46 ± 0.81** |

Tabla 74: Acción de la acridina BC-203 sobre células HeLa parasitadas con *Trypanosoma cruzi*.

[Valor medio ± S.E.M. \*\* p<0.01; \* p<0.05].

| Dosis (µg/ml) | Horas post-infección. |               |              |               |              |               |
|---------------|-----------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
|               | 24 h.                 |               | 48 h.        |               | 72 h.        |               |
|               | SP                    | Ii            | SP           | Ii            | SP           | Ii            |
| Control       | 23.41 ± 1.10          | 1.52 ± 0.03   | 18.18 ± 2.21 | 2.26 ± 0.17   | 15.19 ± 1.67 | 6.94 ± 0.41   |
| 10            | 18.32 ± 2.19          | 1.03 ± 0.07** | 14.16 ± 0.38 | 1.42 ± 0.21** | 11.03 ± 1.97 | 2.04 ± 0.34** |
| 1             | 21.17 ± 2.33          | 1.39 ± 0.03** | 16.22 ± 1.06 | 1.97 ± 0.34** | 12.41 ± 2.17 | 4.41 ± 0.66** |
| 0.5           | 23.14 ± 1.92          | 1.50 ± 0.09*  | 18.10 ± 1.81 | 2.18 ± 0.05** | 14.34 ± 2.00 | 5.10 ± 0.71** |

Tabla 75: Acción de la acridina BC-237 sobre células HeLa parasitadas con *Trypanosoma cruzi*.

[Valor medio ± S.E.M. \*\* p<0.01; \* p<0.05].

| Dosis (µg/ml) | Horas post-infección. |               |              |               |              |               |
|---------------|-----------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
|               | 24 h.                 |               | 48 h.        |               | 72 h.        |               |
|               | SP                    | Ii            | SP           | Ii            | SP           | Ii            |
| Control       | 23.41 ± 1.10          | 1.52 ± 0.03   | 18.18 ± 2.21 | 2.26 ± 0.17   | 15.19 ± 1.67 | 6.94 ± 0.41   |
| 10            | 16.21 ± 1.69          | 1.16 ± 0.02** | 12.16 ± 1.16 | 1.49 ± 0.07** | 09.16 ± 1.32 | 2.14 ± 0.33** |
| 1             | 19.41 ± 2.03          | 1.19 ± 0.10** | 14.18 ± 1.49 | 1.83 ± 0.08** | 12.16 ± 1.28 | 4.27 ± 0.34** |
| 0.5           | 20.39 ± 1.70          | 1.52 ± 0.06   | 17.28 ± 1.33 | 2.04 ± 0.13** | 12.98 ± 1.31 | 4.66 ± 0.31** |

Tabla 76: Acción de la acridina BC-289 sobre células HeLa parasitadas con *Trypanosoma cruzi*.

[Valor medio ± S.E.M. \*\* p<0.01; \* p<0.05].

| Dosis (µg/ml) | Horas post-infección. |               |              |               |              |               |
|---------------|-----------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
|               | 24 h.                 |               | 48 h.        |               | 72 h.        |               |
|               | SP                    | Ii            | SP           | Ii            | SP           | Ii            |
| Control       | 23.41 ± 1.10          | 1.52 ± 0.03   | 18.18 ± 2.21 | 2.26 ± 0.17   | 15.19 ± 1.67 | 6.94 ± 0.41   |
| 10            | 19.41 ± 0.39          | 1.12 ± 0.19** | 13.17 ± 1.78 | 1.33 ± 0.59** | 12.16 ± 0.89 | 2.04 ± 0.43** |
| 1             | 22.41 ± 0.61          | 1.41 ± 0.09** | 15.18 ± 2.41 | 1.56 ± 0.32** | 14.16 ± 0.41 | 3.16 ± 0.09** |
| 0.5           | 23.40 ± 1.40          | 1.49 ± 0.23   | 17.13 ± 0.61 | 1.97 ± 0.09** | 14.18 ± 0.71 | 4.19 ± 0.33** |

Tabla 77: Acción del ligando Ethylxantato de K' sobre macrófagos J-774 parasitados con *Leishmania donovani*.  
[Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                   |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                   |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii                | SP               | Ii                |
| Control                    | 14.16 $\pm$ 1.18      | 1.24 $\pm$ 0.06   | 13.22 $\pm$ 2.19 | 1.97 $\pm$ 0.23   | 09.21 $\pm$ 2.01 | 3.48 $\pm$ 0.38   |
| 1                          | 12.18 $\pm$ 0.17      | 1.11 $\pm$ 0.15** | 10.16 $\pm$ 0.91 | 1.42 $\pm$ 0.15** | 07.89 $\pm$ 1.81 | 1.91 $\pm$ 0.23** |
| 0.5                        | 12.41 $\pm$ 1.41      | 1.18 $\pm$ 0.09** | 12.21 $\pm$ 0.71 | 1.52 $\pm$ 0.49** | 07.94 $\pm$ 1.71 | 2.10 $\pm$ 0.89** |

Tabla 78: Acción del ligando Ethylxantato de K' sobre macrófagos J-774 parasitados con *Leishmania donovani*.  
[Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                   |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                   |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii                | SP               | Ii                |
| Control                    | 14.16 $\pm$ 1.18      | 1.24 $\pm$ 0.06   | 13.22 $\pm$ 2.19 | 1.97 $\pm$ 0.23   | 09.21 $\pm$ 2.01 | 3.48 $\pm$ 0.38   |
| 1                          | 11.41 $\pm$ 0.91      | 1.00 $\pm$ 0.07** | 08.41 $\pm$ 0.39 | 1.32 $\pm$ 0.08** | 06.84 $\pm$ 1.21 | 2.41 $\pm$ 0.32** |
| 0.5                        | 11.94 $\pm$ 0.92      | 1.20 $\pm$ 0.08** | 09.37 $\pm$ 1.91 | 1.54 $\pm$ 0.08** | 06.93 $\pm$ 1.34 | 3.20 $\pm$ 0.81** |

Tabla 79: Acción de la acridina BG-203 sobre macrófagos J-774 parasitados con *Leishmania donovani*.  
[Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                   |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                   |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii                | SP               | Ii                |
| Control                    | 14.16 $\pm$ 1.18      | 1.24 $\pm$ 0.06   | 13.22 $\pm$ 2.19 | 1.97 $\pm$ 0.23   | 09.21 $\pm$ 2.01 | 3.48 $\pm$ 0.38   |
| 1                          | 10.23 $\pm$ 2.31      | 1.04 $\pm$ 0.19** | 09.50 $\pm$ 0.36 | 1.13 $\pm$ 0.09** | 06.42 $\pm$ 1.19 | 2.14 $\pm$ 0.17** |
| 0.5                        | 13.22 $\pm$ 1.61      | 1.16 $\pm$ 0.03** | 12.94 $\pm$ 0.81 | 1.58 $\pm$ 0.01** | 09.08 $\pm$ 1.93 | 3.10 $\pm$ 0.47** |

Tabla 80: Acción de la acridina BG-237 sobre macrófagos J-774 parasitados con *Leishmania donovani*.  
[Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                   |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                   |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii                | SP               | Ii                |
| Control                    | 14.16 $\pm$ 1.18      | 1.24 $\pm$ 0.06   | 13.22 $\pm$ 2.19 | 1.97 $\pm$ 0.23   | 09.21 $\pm$ 2.01 | 3.48 $\pm$ 0.38   |
| 1                          | 11.18 $\pm$ 2.47      | 1.19 $\pm$ 0.12** | 08.41 $\pm$ 2.33 | 1.03 $\pm$ 0.32** | 04.16 $\pm$ 0.71 | 2.03 $\pm$ 0.40** |
| 0.5                        | 13.91 $\pm$ 0.63      | 1.20 $\pm$ 0.02   | 10.04 $\pm$ 1.30 | 1.62 $\pm$ 0.61** | 06.93 $\pm$ 1.18 | 2.98 $\pm$ 0.19** |

Tabla 81: Acción de la acridina BG-289 sobre macrófagos J-774 parasitados con *Leishmania donovani*.  
[Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                   |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                   |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii                | SP               | Ii                |
| Control                    | 14.16 $\pm$ 1.18      | 1.24 $\pm$ 0.06   | 13.22 $\pm$ 2.19 | 1.97 $\pm$ 0.23   | 09.21 $\pm$ 2.01 | 3.48 $\pm$ 0.38   |
| 1                          | 12.14 $\pm$ 1.71      | 1.16 $\pm$ 0.31** | 09.24 $\pm$ 1.18 | 1.40 $\pm$ 0.41** | 07.16 $\pm$ 1.17 | 1.94 $\pm$ 0.81** |
| 0.5                        | 12.89 $\pm$ 1.91      | 1.20 $\pm$ 0.07*  | 11.13 $\pm$ 1.04 | 1.63 $\pm$ 0.77** | 08.19 $\pm$ 1.62 | 2.16 $\pm$ 0.47** |

**3.O. Acción en la interiorización en macrófagos J-774A.1 y en células HeLa, de formas promastigotas de *L. donovani* y metacíclicas de *T. cruzi* respectivamente; habiendo previamente tratado a los parásitos con los compuestos seleccionados.**

Los parásitos fueron tratados durante 2 horas con los compuestos, y posteriormente se infectaron las células tal y como se indica en el apartado 2.B.2.B.5. Se determinó el porcentaje de parasitación y el índice de infección a las 24, 48 y 72 horas post-infección.

Los resultados se muestran en las tablas 82 a 91, y son la media de 5 ensayos experimentales, estudiándose los valores ya indicados en 500 células, elegidas al azar de cada uno de los lotes experimentales. A los datos se les realizó un tratamiento estadístico, consistente en un análisis de proporciones y en un T-test de Student.

crusí pretratadas. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | II                | SP               | II                | SP               | II                 |
| Control                    | 42.16 $\pm$ 0.91      | 2.31 $\pm$ 0.09   | 31.17 $\pm$ 0.84 | 7.18 $\pm$ 0.32   | 23.16 $\pm$ 0.71 | 13.05 $\pm$ 0.38   |
| 100                        | 26.17 $\pm$ 3.19*     | 1.93 $\pm$ 0.04** | 23.41 $\pm$ 2.17 | 5.43 $\pm$ 0.42** | 17.14 $\pm$ 0.97 | 11.17 $\pm$ 0.34** |
| 10                         | 29.43 $\pm$ 1.19      | 2.03 $\pm$ 0.34** | 24.15 $\pm$ 1.71 | 5.46 $\pm$ 0.40** | 20.43 $\pm$ 0.81 | 12.42 $\pm$ 0.53** |
| 1                          | 36.27 $\pm$ 0.97      | 2.21 $\pm$ 0.60   | 31.00 $\pm$ 0.72 | 6.17 $\pm$ 0.41** | 22.40 $\pm$ 0.85 | 13.04 $\pm$ 0.49   |

Tabla 83: Acción del ligando Ethylxantato de K<sup>+</sup> en la interiorización en células HeLa de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* pretratadas. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | II                | SP               | II                | SP               | II                 |
| Control                    | 42.16 $\pm$ 0.91      | 2.31 $\pm$ 0.09   | 31.17 $\pm$ 0.84 | 7.18 $\pm$ 0.32   | 23.16 $\pm$ 0.71 | 13.05 $\pm$ 0.38   |
| 100                        | 31.43 $\pm$ 3.37      | 2.03 $\pm$ 0.01** | 26.42 $\pm$ 2.19 | 5.42 $\pm$ 0.32** | 20.18 $\pm$ 0.89 | 12.03 $\pm$ 0.37** |
| 10                         | 34.18 $\pm$ 2.18      | 2.19 $\pm$ 0.31** | 29.43 $\pm$ 1.14 | 6.16 $\pm$ 0.20** | 20.97 $\pm$ 0.41 | 12.93 $\pm$ 0.32*  |
| 1                          | 40.41 $\pm$ 0.13      | 2.30 $\pm$ 0.20   | 29.94 $\pm$ 0.81 | 7.16 $\pm$ 0.31   | 22.31 $\pm$ 0.71 | 13.00 $\pm$ 0.41   |

Tabla 84: Acción de la acridina 86-203 en la interiorización en células HeLa de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* pretratadas. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | II                | SP               | II                | SP               | II                 |
| Control                    | 42.16 $\pm$ 0.91      | 2.31 $\pm$ 0.09   | 31.17 $\pm$ 0.84 | 7.18 $\pm$ 0.32   | 23.16 $\pm$ 0.71 | 13.05 $\pm$ 0.38   |
| 100                        | 32.14 $\pm$ 0.63      | 2.11 $\pm$ 0.06** | 28.16 $\pm$ 0.39 | 6.34 $\pm$ 0.21** | 21.17 $\pm$ 0.91 | 10.17 $\pm$ 0.19** |
| 10                         | 34.28 $\pm$ 0.31      | 2.24 $\pm$ 0.06** | 30.14 $\pm$ 0.68 | 7.10 $\pm$ 0.31   | 23.14 $\pm$ 0.78 | 13.90 $\pm$ 0.44   |
| 1                          | 38.16 $\pm$ 0.47      | 2.26 $\pm$ 0.07** | 30.18 $\pm$ 0.51 | 7.16 $\pm$ 0.37   | 23.15 $\pm$ 0.68 | 13.02 $\pm$ 0.71   |

Tabla 85: Acción de la acridina 86-237 en la interiorización en células HeLa de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* pretratadas. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | II                | SP               | II                | SP               | II                 |
| Control                    | 42.16 $\pm$ 0.91      | 2.31 $\pm$ 0.09   | 31.17 $\pm$ 0.84 | 7.18 $\pm$ 0.32   | 23.16 $\pm$ 0.71 | 13.05 $\pm$ 0.38   |
| 100                        | 36.18 $\pm$ 0.17      | 1.93 $\pm$ 0.03** | 27.14 $\pm$ 0.41 | 6.90 $\pm$ 0.12** | 20.17 $\pm$ 0.08 | 09.07 $\pm$ 0.02** |
| 10                         | 39.23 $\pm$ 0.51      | 1.97 $\pm$ 0.17** | 31.04 $\pm$ 0.61 | 7.12 $\pm$ 0.32   | 22.41 $\pm$ 0.18 | 11.10 $\pm$ 0.34** |
| 1                          | 41.15 $\pm$ 0.32      | 2.18 $\pm$ 0.16** | 31.10 $\pm$ 0.69 | 7.13 $\pm$ 0.06   | 22.67 $\pm$ 0.32 | 12.43 $\pm$ 0.41** |

Tabla 86: Acción de la acridina 86-289 en la interiorización en células HeLa de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* pretratadas. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | II                | SP               | II                | SP               | II                 |
| Control                    | 42.16 $\pm$ 0.91      | 2.31 $\pm$ 0.09   | 31.17 $\pm$ 0.84 | 7.18 $\pm$ 0.32   | 23.16 $\pm$ 0.71 | 13.05 $\pm$ 0.38   |
| 100                        | 28.17 $\pm$ 0.52      | 1.93 $\pm$ 0.01** | 23.14 $\pm$ 0.81 | 5.94 $\pm$ 0.62** | 20.18 $\pm$ 1.17 | 09.17 $\pm$ 0.08** |
| 10                         | 29.18 $\pm$ 0.32      | 2.15 $\pm$ 0.09** | 27.18 $\pm$ 0.53 | 6.17 $\pm$ 0.41** | 22.41 $\pm$ 0.72 | 11.17 $\pm$ 0.41** |
| 1                          | 33.16 $\pm$ 0.72      | 2.30 $\pm$ 0.03   | 30.27 $\pm$ 0.81 | 6.94 $\pm$ 0.68*  | 22.43 $\pm$ 0.19 | 12.47 $\pm$ 0.87** |

Tabla 87: Acción del complejo  $Rh^{III}$ -Ethylxantato en la interiorización en macrófagos J-774 de formas promastigotes de *Leishmania donovani* pretratadas. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii                | SP               | Ii                 |
| Control                    | 26.15 $\pm$ 0.81      | 1.43 $\pm$ 0.03   | 16.16 $\pm$ 0.47 | 4.21 $\pm$ 0.18   | 12.18 $\pm$ 0.60 | 07.29 $\pm$ 0.71   |
| 100                        | 17.18 $\pm$ 2.37      | 1.10 $\pm$ 0.16** | 12.17 $\pm$ 1.86 | 3.97 $\pm$ 0.32** | 10.23 $\pm$ 0.97 | 06.41 $\pm$ 0.34** |
| 10                         | 21.43 $\pm$ 0.78      | 1.31 $\pm$ 0.34** | 10.43 $\pm$ 1.43 | 3.98 $\pm$ 0.20** | 12.00 $\pm$ 0.80 | 07.11 $\pm$ 0.43*  |
| 1                          | 25.91 $\pm$ 0.81      | 1.36 $\pm$ 0.31*  | 12.21 $\pm$ 0.32 | 3.91 $\pm$ 0.81** | 12.16 $\pm$ 0.61 | 07.20 $\pm$ 0.47   |

Tabla 88: Acción del ligando Ethylxantato de  $K^+$  en la interiorización en macrófagos J-774 de formas promastigotes de *Leishmania donovani* pretratadas. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                 |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-----------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                 | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii              | SP               | Ii                 |
| Control                    | 26.15 $\pm$ 0.81      | 1.43 $\pm$ 0.03   | 16.16 $\pm$ 0.47 | 4.21 $\pm$ 0.18 | 12.18 $\pm$ 0.60 | 07.29 $\pm$ 0.71   |
| 100                        | 20.41 $\pm$ 0.97      | 1.40 $\pm$ 0.06** | 14.27 $\pm$ 0.92 | 4.16 $\pm$ 0.31 | 11.00 $\pm$ 1.34 | 06.93 $\pm$ 0.65** |
| 10                         | 24.92 $\pm$ 0.39      | 1.26 $\pm$ 0.07** | 13.28 $\pm$ 0.91 | 4.00 $\pm$ 0.66 | 12.17 $\pm$ 1.32 | 07.18 $\pm$ 0.65   |
| 1                          | 26.00 $\pm$ 0.86      | 1.41 $\pm$ 0.45   | 15.17 $\pm$ 0.63 | 4.20 $\pm$ 0.81 | 12.18 $\pm$ 0.18 | 07.20 $\pm$ 0.32   |

Tabla 89: Acción de la acridina BG-203 en la interiorización en macrófagos J-774 de formas promastigotes de *Leishmania donovani* pretratadas. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                 |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-----------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                 | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii              | SP               | Ii                 |
| Control                    | 26.15 $\pm$ 0.81      | 1.43 $\pm$ 0.03   | 16.16 $\pm$ 0.47 | 4.21 $\pm$ 0.18 | 12.18 $\pm$ 0.60 | 07.29 $\pm$ 0.71   |
| 100                        | 15.14 $\pm$ 0.61      | 1.24 $\pm$ 0.10** | 13.21 $\pm$ 0.71 | 4.20 $\pm$ 0.56 | 09.17 $\pm$ 0.91 | 05.41 $\pm$ 0.18** |
| 10                         | 18.23 $\pm$ 0.51      | 1.32 $\pm$ 0.09** | 15.21 $\pm$ 0.72 | 4.20 $\pm$ 0.19 | 11.14 $\pm$ 0.72 | 07.21 $\pm$ 0.59   |
| 1                          | 23.18 $\pm$ 0.71      | 1.41 $\pm$ 0.09*  | 16.17 $\pm$ 0.82 | 4.20 $\pm$ 0.19 | 11.91 $\pm$ 0.61 | 07.20 $\pm$ 0.56   |

Tabla 90: Acción de la acridina BG-217 en la interiorización en macrófagos J-774 de formas promastigotes de *Leishmania donovani* pretratadas. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii                | SP               | Ii                 |
| Control                    | 26.15 $\pm$ 0.81      | 1.43 $\pm$ 0.03   | 16.16 $\pm$ 0.47 | 4.21 $\pm$ 0.18   | 12.18 $\pm$ 0.60 | 07.29 $\pm$ 0.71   |
| 100                        | 13.18 $\pm$ 0.93      | 1.00 $\pm$ 0.10** | 11.43 $\pm$ 0.88 | 2.18 $\pm$ 0.09** | 10.11 $\pm$ 0.48 | 06.18 $\pm$ 0.51** |
| 10                         | 16.23 $\pm$ 1.18      | 1.16 $\pm$ 0.16** | 16.00 $\pm$ 0.47 | 3.18 $\pm$ 0.09** | 12.03 $\pm$ 0.71 | 07.10 $\pm$ 0.81   |
| 1                          | 20.43 $\pm$ 1.33      | 1.21 $\pm$ 0.19** | 16.16 $\pm$ 0.68 | 4.00 $\pm$ 0.51** | 12.10 $\pm$ 0.87 | 07.12 $\pm$ 0.66   |

Tabla 91: Acción de la acridina BG-289 en la interiorización en macrófagos J-774 de formas promastigotes de *Leishmania donovani* pretratadas. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii                | SP               | Ii                 |
| Control                    | 26.15 $\pm$ 0.81      | 1.43 $\pm$ 0.03   | 16.16 $\pm$ 0.47 | 4.21 $\pm$ 0.18   | 12.18 $\pm$ 0.60 | 07.29 $\pm$ 0.71   |
| 100                        | 18.91 $\pm$ 3.19      | 1.00 $\pm$ 0.03** | 14.17 $\pm$ 1.81 | 3.47 $\pm$ 0.42** | 10.11 $\pm$ 0.97 | 06.33 $\pm$ 0.31** |
| 10                         | 23.41 $\pm$ 2.19      | 1.30 $\pm$ 0.71   | 14.32 $\pm$ 1.39 | 4.00 $\pm$ 0.18** | 11.40 $\pm$ 0.80 | 06.94 $\pm$ 0.53** |
| 1                          | 25.93 $\pm$ 0.87      | 1.42 $\pm$ 0.40   | 14.97 $\pm$ 0.93 | 4.18 $\pm$ 0.31   | 12.10 $\pm$ 0.64 | 07.00 $\pm$ 0.47** |

**3.P. Efecto del pretratamiento con los compuestos seleccionados de las formas promastigotas de *L. donovani* y tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*, en la internalización en las líneas celulares J-774A.1 y HeLa respectivamente.**

En este caso las células se trataron durante 2 horas con los compuestos, y posteriormente se sometieron al proceso de infección tal y como se indica en el apartado 2.B.2.B.6.

Los resultados se muestran en las tablas 92 a 101, y son la media de 5 ensayos experimentales, estudiándose los valores ya indicados en 500 células, elegidas al azar de cada uno de los lotes experimentales. A los datos se les realizó un tratamiento estadístico, consistente en un análisis de proporciones y en un T-test de Student.

Tabla 92: Acción del complejo  $Rh^{III}$ -Ethylnantato en la interiorización en células HeLa pretratadas de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii                | SP               | Ii                 |
| Control                    | 18.16 $\pm$ 0.34      | 1.36 $\pm$ 0.06   | 12.16 $\pm$ 0.58 | 1.59 $\pm$ 0.31   | 11.17 $\pm$ 0.61 | 03.41 $\pm$ 0.47   |
| 10                         | 10.21 $\pm$ 0.80      | 1.26 $\pm$ 0.06** | 06.21 $\pm$ 1.31 | 1.34 $\pm$ 0.09** | 06.24 $\pm$ 1.19 | 02.18 $\pm$ 0.46** |
| 1                          | 13.24 $\pm$ 1.97      | 1.26 $\pm$ 0.18** | 08.16 $\pm$ 2.04 | 1.50 $\pm$ 0.31*  | 06.29 $\pm$ 2.71 | 02.48 $\pm$ 0.46** |

Tabla 93: Acción del ligando Ethylnantato de  $K^+$  en la interiorización en células HeLa pretratadas de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii                | SP               | Ii                 |
| Control                    | 18.16 $\pm$ 0.34      | 1.36 $\pm$ 0.06   | 12.16 $\pm$ 0.58 | 1.59 $\pm$ 0.31   | 11.17 $\pm$ 0.61 | 03.41 $\pm$ 0.47   |
| 10                         | 13.23 $\pm$ 0.28      | 1.28 $\pm$ 0.08** | 07.31 $\pm$ 0.97 | 1.10 $\pm$ 0.10** | 07.22 $\pm$ 0.39 | 01.96 $\pm$ 0.48** |
| 1                          | 16.16 $\pm$ 0.71      | 1.30 $\pm$ 0.06   | 08.27 $\pm$ 0.81 | 1.31 $\pm$ 0.33** | 08.15 $\pm$ 0.91 | 02.18 $\pm$ 0.02** |

Tabla 94: Acción de la acridina 96-203 en la interiorización en células HeLa pretratadas de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii                | SP               | Ii                 |
| Control                    | 18.16 $\pm$ 0.34      | 1.36 $\pm$ 0.06   | 12.16 $\pm$ 0.58 | 1.59 $\pm$ 0.31   | 11.17 $\pm$ 0.61 | 03.41 $\pm$ 0.47   |
| 10                         | 13.21 $\pm$ 0.65      | 1.27 $\pm$ 0.12** | 10.17 $\pm$ 0.82 | 1.29 $\pm$ 0.24** | 09.21 $\pm$ 0.97 | 03.00 $\pm$ 0.61** |
| 1                          | 14.18 $\pm$ 0.72      | 1.32 $\pm$ 0.10** | 12.10 $\pm$ 0.66 | 1.33 $\pm$ 0.32** | 10.30 $\pm$ 0.34 | 03.34 $\pm$ 0.31   |

Tabla 95: Acción de la acridina 96-237 en la interiorización en células HeLa pretratadas de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                  |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                  | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii               | SP               | Ii                 |
| Control                    | 18.16 $\pm$ 0.34      | 1.36 $\pm$ 0.06   | 12.16 $\pm$ 0.58 | 1.59 $\pm$ 0.31  | 11.17 $\pm$ 0.61 | 03.41 $\pm$ 0.47   |
| 10                         | 18.02 $\pm$ 0.74      | 1.31 $\pm$ 0.06** | 09.21 $\pm$ 0.47 | 1.41 $\pm$ 0.83* | 07.23 $\pm$ 0.96 | 01.94 $\pm$ 0.34** |
| 1                          | 18.10 $\pm$ 0.89      | 1.32 $\pm$ 0.04** | 10.10 $\pm$ 0.56 | 1.40 $\pm$ 0.34  | 10.10 $\pm$ 1.19 | 02.48 $\pm$ 0.08** |

Tabla 96: Acción de la acridina 96-289 en la interiorización en células HeLa pretratadas de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | SP                    | Ii                | SP               | Ii                | SP               | Ii                 |
| Control                    | 18.16 $\pm$ 0.34      | 1.36 $\pm$ 0.06   | 12.16 $\pm$ 0.58 | 1.59 $\pm$ 0.31   | 11.17 $\pm$ 0.61 | 03.41 $\pm$ 0.47   |
| 10                         | 15.34 $\pm$ 0.43      | 1.27 $\pm$ 0.09** | 11.42 $\pm$ 0.27 | 1.47 $\pm$ 0.10** | 09.23 $\pm$ 0.34 | 02.97 $\pm$ 0.89** |
| 1                          | 18.10 $\pm$ 0.58      | 1.29 $\pm$ 0.04** | 11.91 $\pm$ 0.71 | 1.53 $\pm$ 0.41   | 10.05 $\pm$ 0.56 | 03.90 $\pm$ 0.67   |



Tabla 97: Acción sobre la interiorización de formas promastigotes de *Leishmania donovani* en macrófagos J-774 pretratados con el complejo Rh<sup>123</sup>-Ethylnantato. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | VP                    | Ii                | VP               | Ii                | VP               | Ii                 |
| Control                    | 11.18 $\pm$ 0.34      | 1.41 $\pm$ 0.10   | 10.31 $\pm$ 0.61 | 1.92 $\pm$ 0.31   | 08.93 $\pm$ 0.58 | 02.94 $\pm$ 0.71   |
| 1                          | 07.15 $\pm$ 0.71      | 1.31 $\pm$ 0.09** | 06.21 $\pm$ 1.16 | 1.40 $\pm$ 0.04** | 04.94 $\pm$ 1.16 | 01.96 $\pm$ 0.36** |
| 0.5                        | 08.21 $\pm$ 0.96      | 1.39 $\pm$ 0.18   | 08.16 $\pm$ 0.21 | 1.42 $\pm$ 0.41** | 06.23 $\pm$ 1.61 | 02.48 $\pm$ 0.42** |

Tabla 98: Acción sobre la interiorización de formas promastigotes de *Leishmania donovani* en macrófagos J-774 pretratados con el ligando Ethylnantato de K'. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                 |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                 | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | VP                    | Ii              | VP               | Ii                | VP               | Ii                 |
| Control                    | 11.18 $\pm$ 0.34      | 1.41 $\pm$ 0.10 | 10.31 $\pm$ 0.61 | 1.92 $\pm$ 0.31   | 08.93 $\pm$ 0.58 | 02.94 $\pm$ 0.71   |
| 1                          | 08.31 $\pm$ 0.31      | 1.40 $\pm$ 0.06 | 07.11 $\pm$ 0.70 | 1.31 $\pm$ 0.72** | 05.31 $\pm$ 1.21 | 02.16 $\pm$ 0.41** |
| 0.5                        | 10.15 $\pm$ 1.61      | 1.41 $\pm$ 0.08 | 09.36 $\pm$ 1.41 | 1.49 $\pm$ 0.19** | 08.91 $\pm$ 1.46 | 02.90 $\pm$ 0.91   |

Tabla 99: Acción sobre la interiorización de formas promastigotes de *Leishmania donovani* en macrófagos J-774 pretratados con la acridina BC-203. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | VP                    | Ii                | VP               | Ii                | VP               | Ii                 |
| Control                    | 11.18 $\pm$ 0.34      | 1.41 $\pm$ 0.10   | 10.31 $\pm$ 0.61 | 1.92 $\pm$ 0.31   | 08.93 $\pm$ 0.58 | 02.94 $\pm$ 0.71   |
| 1                          | 10.52 $\pm$ 0.36      | 1.31 $\pm$ 0.10** | 09.20 $\pm$ 0.32 | 1.43 $\pm$ 0.31** | 05.81 $\pm$ 0.82 | 01.81 $\pm$ 0.30** |
| 0.5                        | 11.03 $\pm$ 0.67      | 1.40 $\pm$ 0.81   | 09.78 $\pm$ 0.41 | 1.81 $\pm$ 0.27*  | 07.23 $\pm$ 0.71 | 02.03 $\pm$ 0.49** |

Tabla 100: Acción sobre la interiorización de formas promastigotes de *Leishmania donovani* en macrófagos J-774 pretratados con la acridina BC-237. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | VP                    | Ii                | VP               | Ii                | VP               | Ii                 |
| Control                    | 11.18 $\pm$ 0.34      | 1.41 $\pm$ 0.10   | 10.31 $\pm$ 0.61 | 1.92 $\pm$ 0.31   | 08.93 $\pm$ 0.58 | 02.94 $\pm$ 0.71   |
| 1                          | 09.23 $\pm$ 0.17      | 1.32 $\pm$ 0.21** | 07.38 $\pm$ 0.67 | 1.29 $\pm$ 0.21** | 03.36 $\pm$ 0.19 | 02.42 $\pm$ 0.82** |
| 0.5                        | 09.39 $\pm$ 0.32      | 1.40 $\pm$ 0.31   | 09.22 $\pm$ 0.54 | 1.62 $\pm$ 0.09** | 05.21 $\pm$ 0.47 | 02.59 $\pm$ 0.91** |

Tabla 101: Acción sobre la interiorización de formas promastigotes de *Leishmania donovani* en macrófagos J-774 pretratados con la acridina BC-289. [Valor medio  $\pm$  S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ ].

| Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Horas post-infección. |                   |                  |                   |                  |                    |
|----------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|
|                            | 24 h.                 |                   | 48 h.            |                   | 72 h.            |                    |
|                            | VP                    | Ii                | VP               | Ii                | VP               | Ii                 |
| Control                    | 11.18 $\pm$ 0.34      | 1.41 $\pm$ 0.10   | 10.31 $\pm$ 0.61 | 1.92 $\pm$ 0.31   | 08.93 $\pm$ 0.58 | 02.94 $\pm$ 0.71   |
| 1                          | 09.16 $\pm$ 0.41      | 1.22 $\pm$ 0.06** | 09.20 $\pm$ 0.70 | 1.37 $\pm$ 0.09** | 05.16 $\pm$ 0.79 | 01.18 $\pm$ 0.68** |
| 0.5                        | 11.16 $\pm$ 0.31      | 1.38 $\pm$ 0.31   | 09.91 $\pm$ 0.46 | 1.39 $\pm$ 0.27** | 07.22 $\pm$ 9.86 | 02.10 $\pm$ 0.51** |

**3.Q. Estudio ultraestructural de las formas promastigotas de *L. donovani* y epimastigotas de *T. cruzi* tratadas con los compuestos seleccionados.**

Se siguió el procedimiento indicado en el apartado 2.D. Los resultados se muestran en las figuras nº 10 a 21.

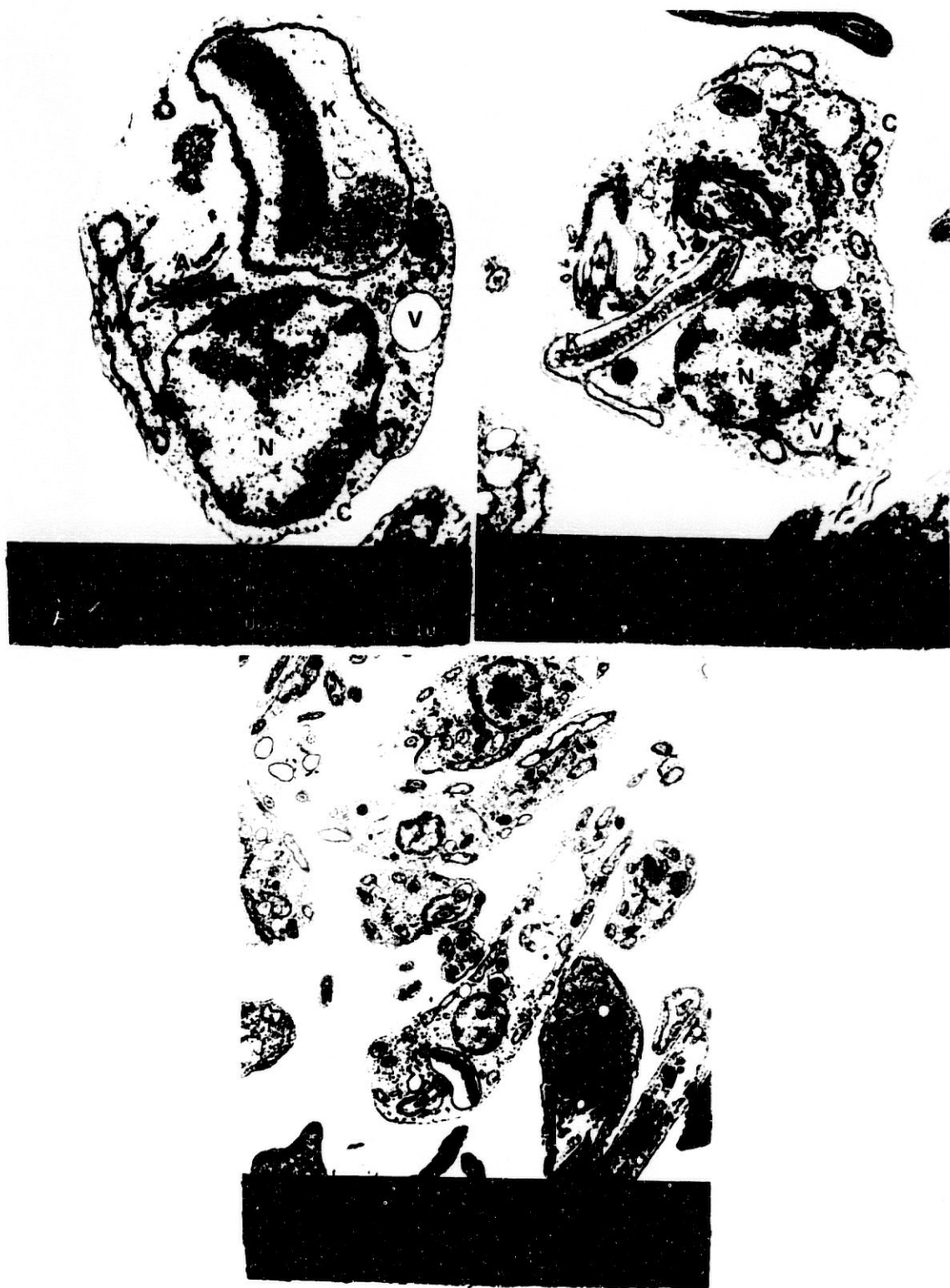


Figura nº 10. Ultraestructura de formas promastigotes no tratadas de *L. donovani*. N= Núcleo. K= Kinetoplasto. A= Aparato de Golgi. C= Citoesqueleto. M= Mitochondria. V= Vacuola Lipídica. F= Flagelo.



Figura nº 11 (continuación). Efecto ultraestructural del complejo  $Rh^{III}$ -Ethixantato, sobre formas promastigotes de *L. donovani*. K= Kinetoplasto. A= Aparato de Golgi. C= Citoesqueleto. M= Mitocondria. V= Vacuola Lipídica. F= Flagelo.



Figura nº 12. Efecto ultraestructural del ligando Ethylxantato de  $K^+$ , sobre formas promastigotes de *L. donovani*. K= Kinetoplasto. A= Aparato de Golgi. C= Citoesqueleto. M= Mitochondria. V= Vacuola Lipídica. F= Flageio.

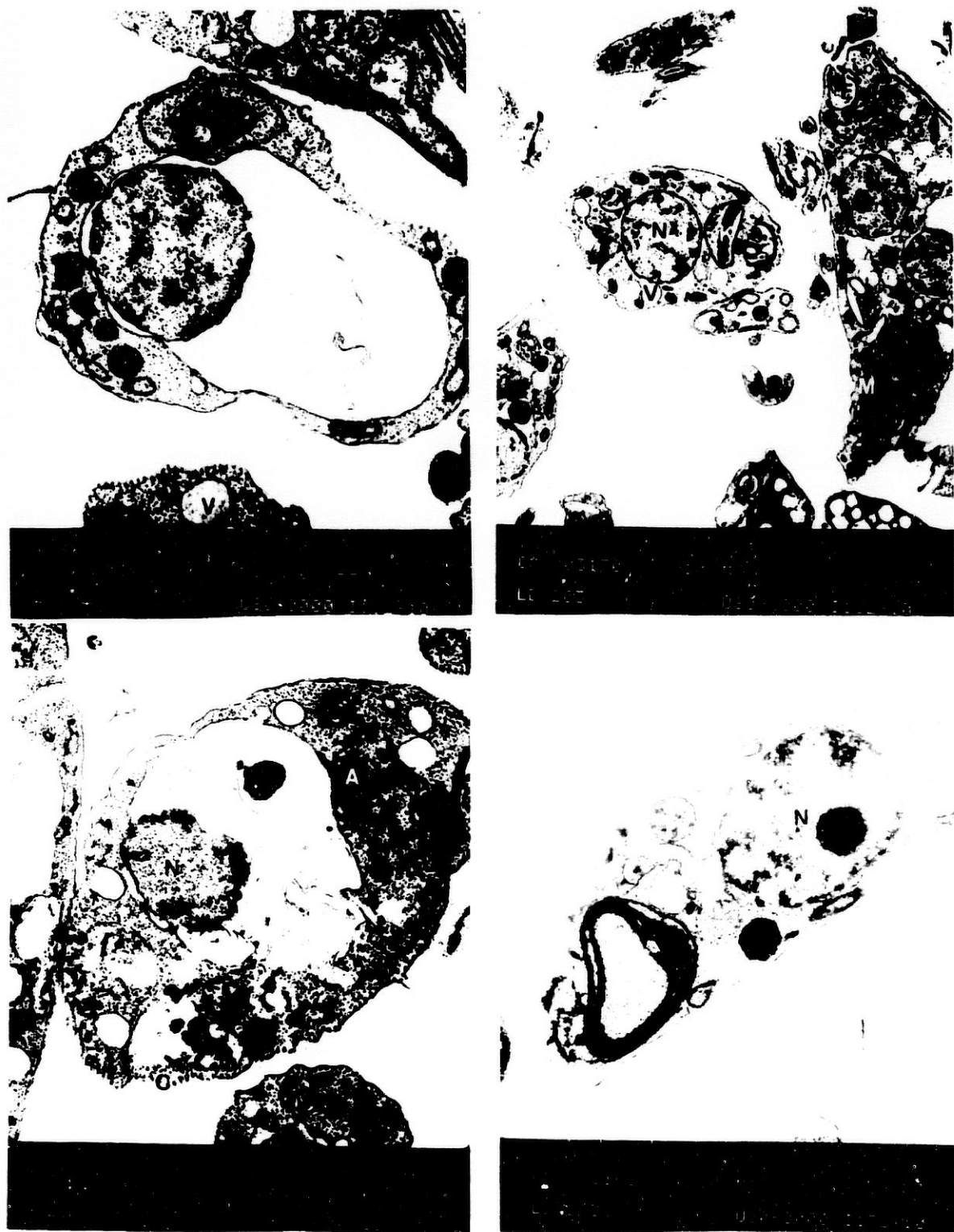


Figura nº 13. Efecto ultraestructural del derivado acridínico BG-203, sobre formas promastigotes de *L. donovani*. K= Kinetoplasto. A= Aparato de Golgi. C= Citoesqueleto. M= Mitochondria. V= Vacuola Lipídica. F= Flagelo.



Figura nº 14. Efecto ultraestructural del derivado acridínico BG-237, sobre formas promastigotes de *L. donovani*. K= Kinetoplasto. A= Aparato de Golgi. C= Citoesqueleto. M= Mitochondria. V= Vacuola Lipídica. F= Flagelo.

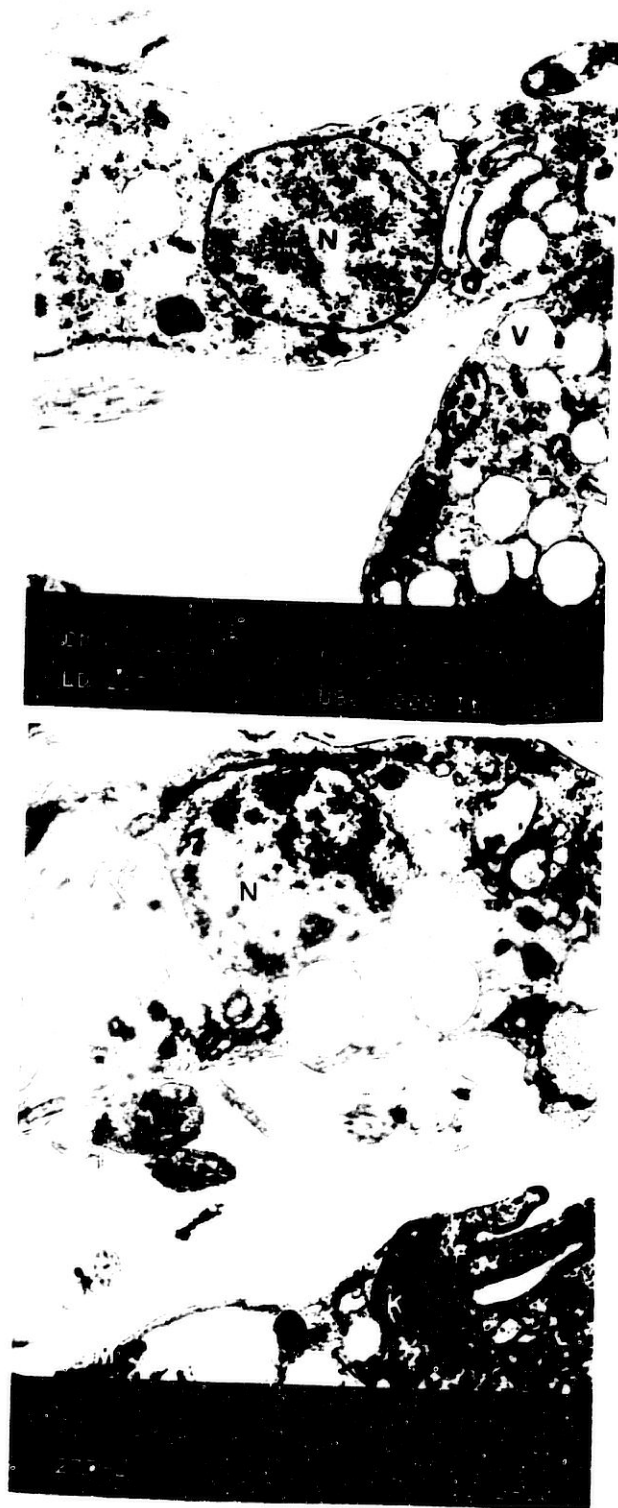


Figura nº 14 (continuación). Efecto ultraestructural del derivado acridínico BG-237, sobre formas promastigotes de *L. donovani*. K= Kinetoplasto. A= Aparato de Golgi. C= Citoesqueleto. M= Mitocondria. V= Vacuola Lipídica. F= Flagelo.



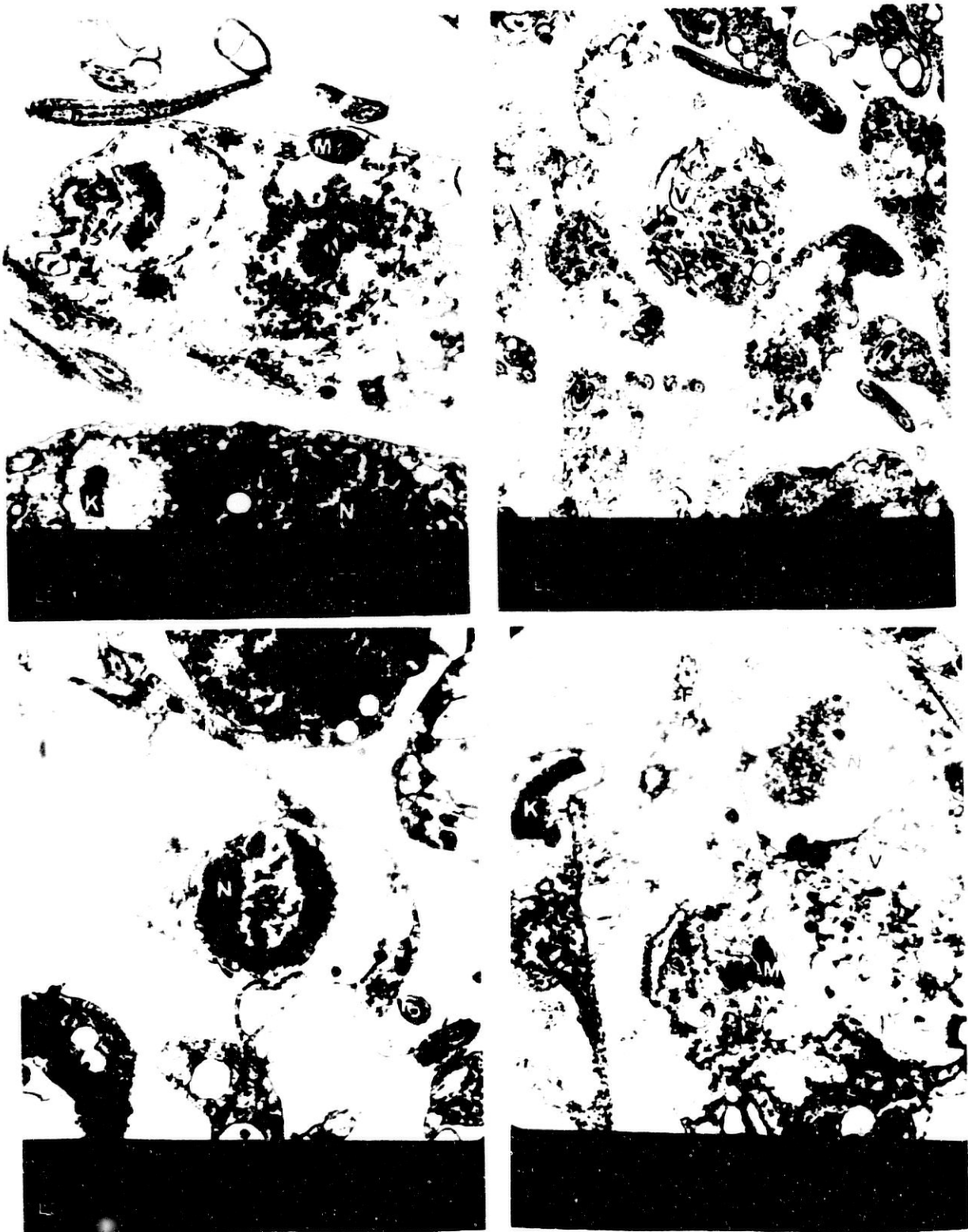


Figura nº 15. Efecto ultraestructural del derivado acridínico BG-289, sobre formas promastigotes de *L. donovani*. K= Kinetoplasto. A= Aparato de Golgi. C= Citoesqueleto. M= Mitocondria. V= Vacuola Lipídica. F= Flagelo.

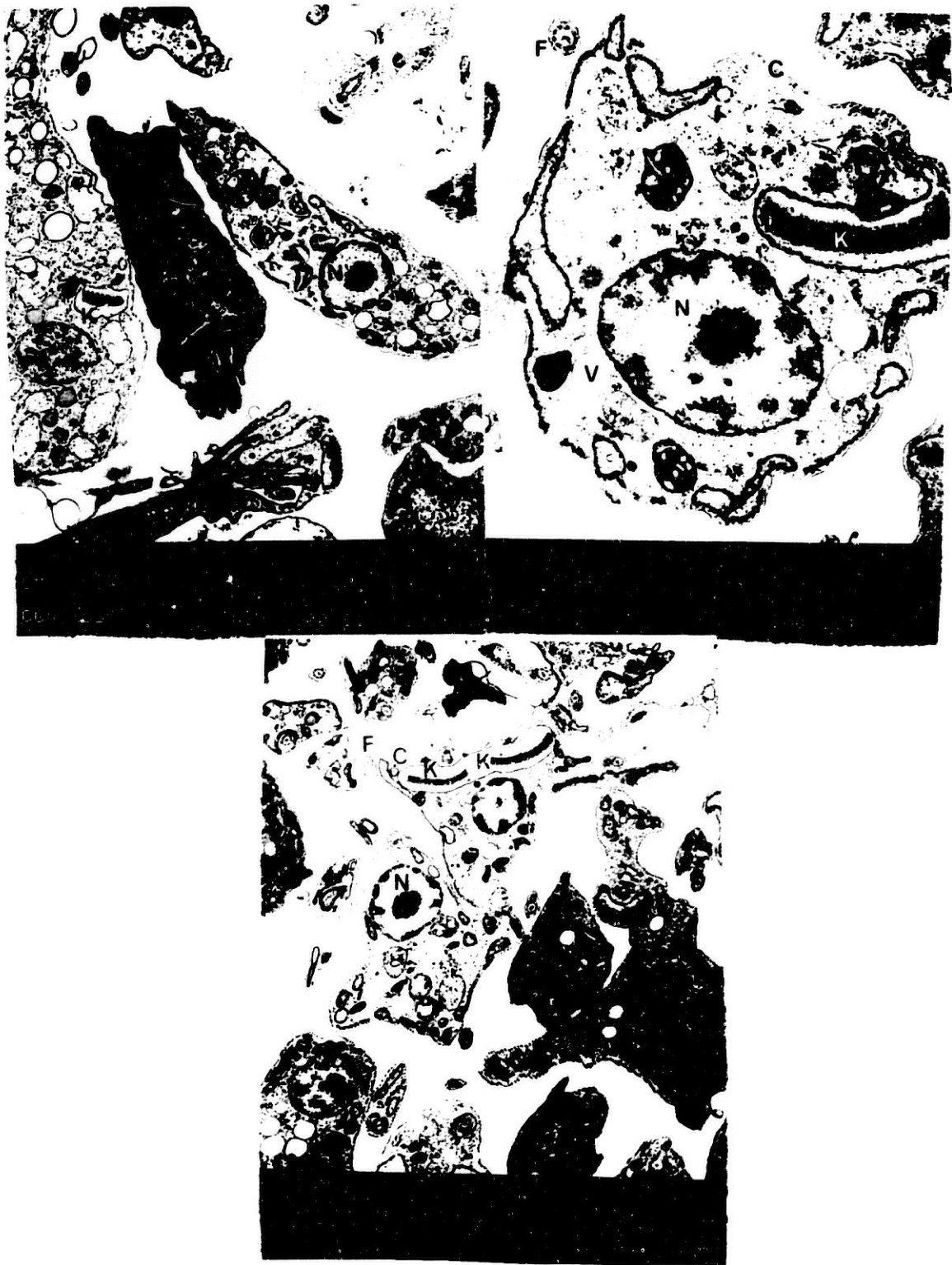


Figura nº 16. Ultraestructura de formas epimastigotes no tratadas de *T. cruzi*. N= Núcleo. K= Kinetoplasto. A= Aparato de Golgi. C= Citoesqueleto. M= Mitochondria. V= Vacuola Lipídica. F= Flagelo.

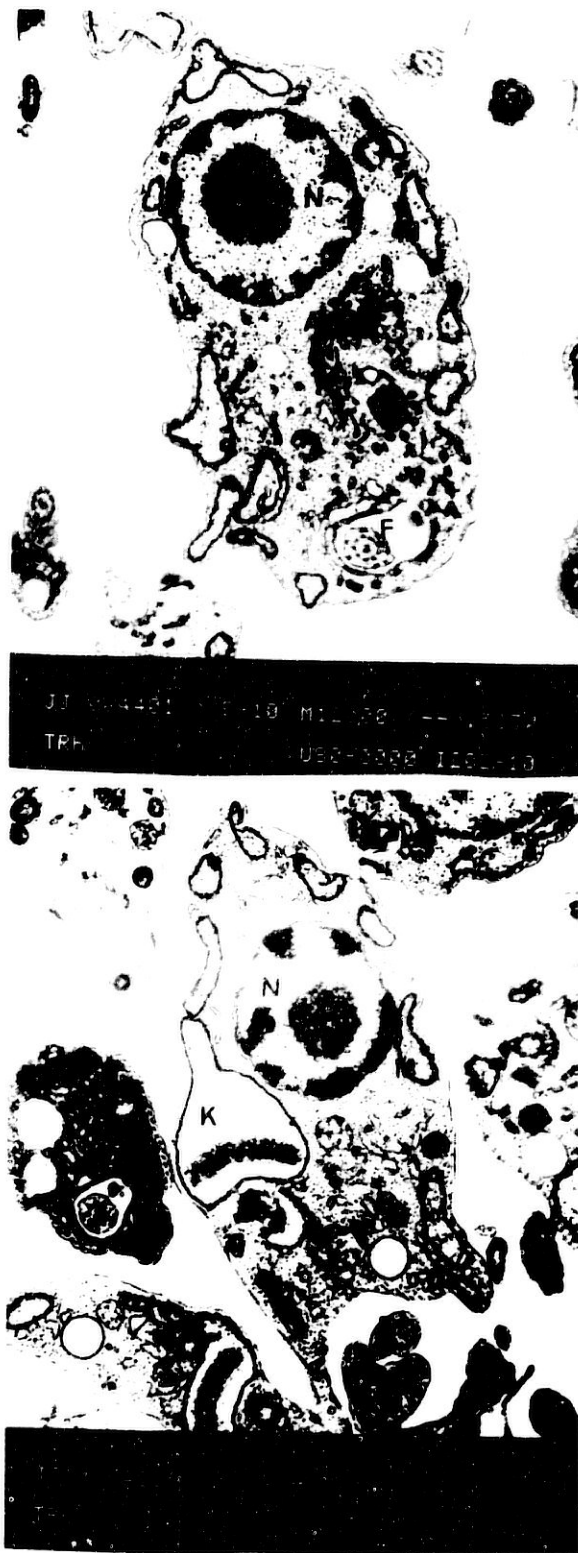


Figura nº 17. Efecto ultraestructural del complejo Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato, sobre formas epimastigotes de *T. cruzi*. K= Kinetoplasto. A= Aparato de Golgi. C= Citoesqueleto. M= Mitochondria. V= Vacuola Lipídica. F= Flagelo.



Figura nº 18. Efecto ultraestructural del ligando Ethylxantato de  $K^+$ , sobre formas epimastigotes de *T. cruzi*. K= Kinetoplasto. A= Aparato de Golgi C= Citoesqueleto. M= Mitochondria. V= Vacuola Lipídica. F= Flagelo.



Figura nº 18 (continuación). Efecto ultraestructural del ligando Ethylxantato de K<sup>+</sup>, sobre formas epimastigotes de *T. cruzi*. K= Kinetoplasto. A= Aparato de Golgi. C= Citoesqueleto. M= Mitochondria. V= Vacuola Lipídica. F= Flagelo.

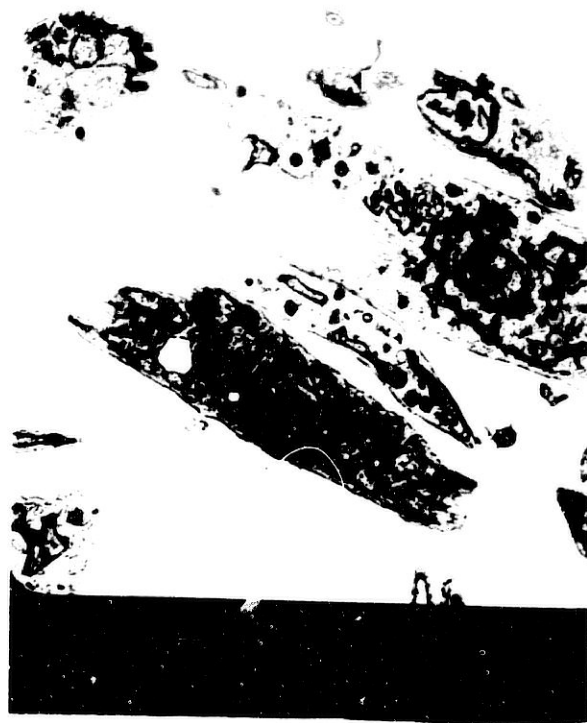


Figura nº 19. Efecto ultraestructural del derivado acridínico BG-203, sobre formas epimastigotes de *T. cruzi*. K= Kinetoplasto. A= Aparato de Golgi. C= Citoesqueleto M= Mitocondria. V= Vacuola Lipídica. F= Flagelo.

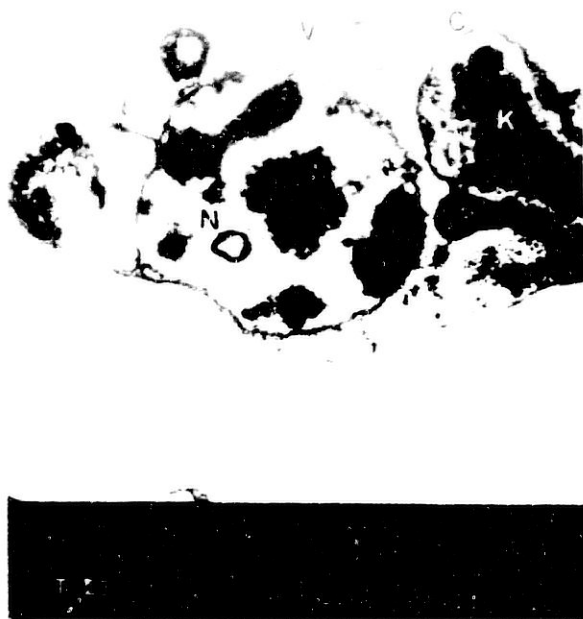


Figura nº 20. Efecto ultraestructural del derivado acridínico BG-237, sobre formas epimastigotes de *T. cruzi*. K= Kinetoplasto. A= Aparato de Golgi. C= Citoesqueleto. M= Mitochondria. V= Vacuola Lipídica. F= Flagelo.

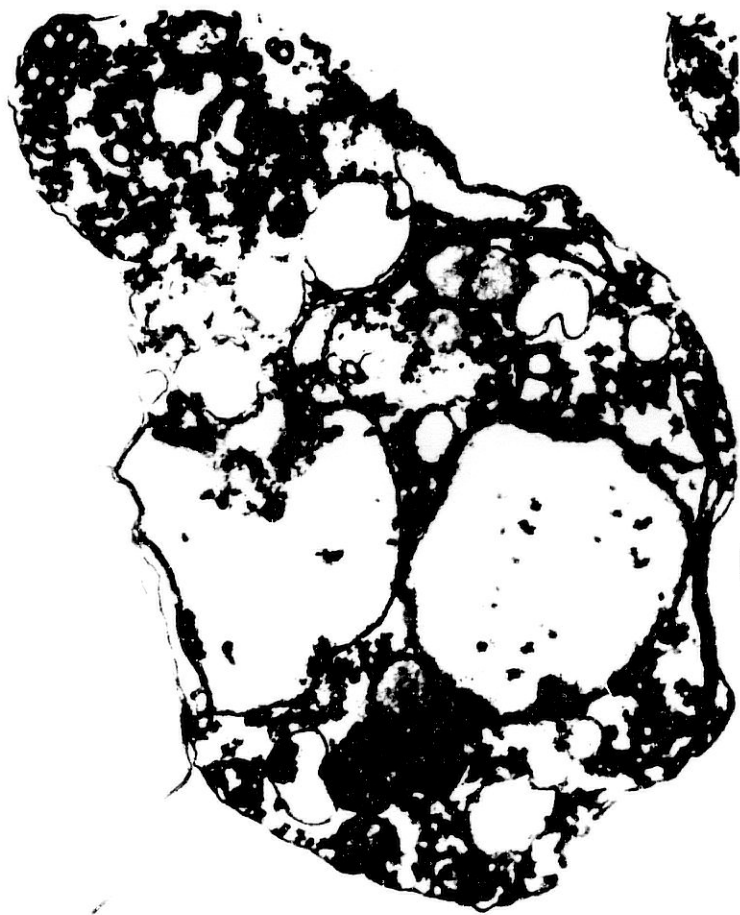


Figura nº 21. Efecto ultraestructural del derivado acridínico BG-289, sobre formas epimastigotes de *T. cruzi*. K= Kinetoplasto. A= Aparato de Golgi. C= Citoesqueleto. M= Mitochondria. V= Vacuola Lipídica. F= Flagelo.



**3.R. Estudio ultraestructural de las células HeLa tratadas con los compuestos seleccionados.**

Los resultados se muestran en las figuras nº 22 a 27; siendo el procedimiento seguido el indicado en el apartado 2.D.



Figura nº 22. Ultraestructura de células HeLa no tratadas. N= Núcleo. M= Mitochondria. P= Polisomas. C= Cromatina. V= Vacuola Lipídica. E= Fenómeno de Endocitosis. R= Retículo Endoplasmático. A= Aparato de Golgi. L= Lisosomas.



Figura nº 23. Ultraestructura de células HeLa tratadas con el complejo  $Rh^{III}$ -Ethylxantato. N= Núcleo. M= Mitocondria. P= Polisomas. C= Cromatina. V= Vacuola Lipídica. E= Fenómeno de Endocitosis. R= Retículo Endoplasmático. A= Aparato de Golgi. L= Lisosomas.



Figura nº 24. Ultraestructura de células HeLa tratadas con el ligando Ethylxantato de K<sup>+</sup>. N= Núcleo. M= Mitocondria. P= Polisomas. C= Cromatina. V= Vacuola Lipídica. E= Fenómeno de Endocitosis. R= Retículo Endoplasmático. A= Aparato de Golgi. L= Lisosomas

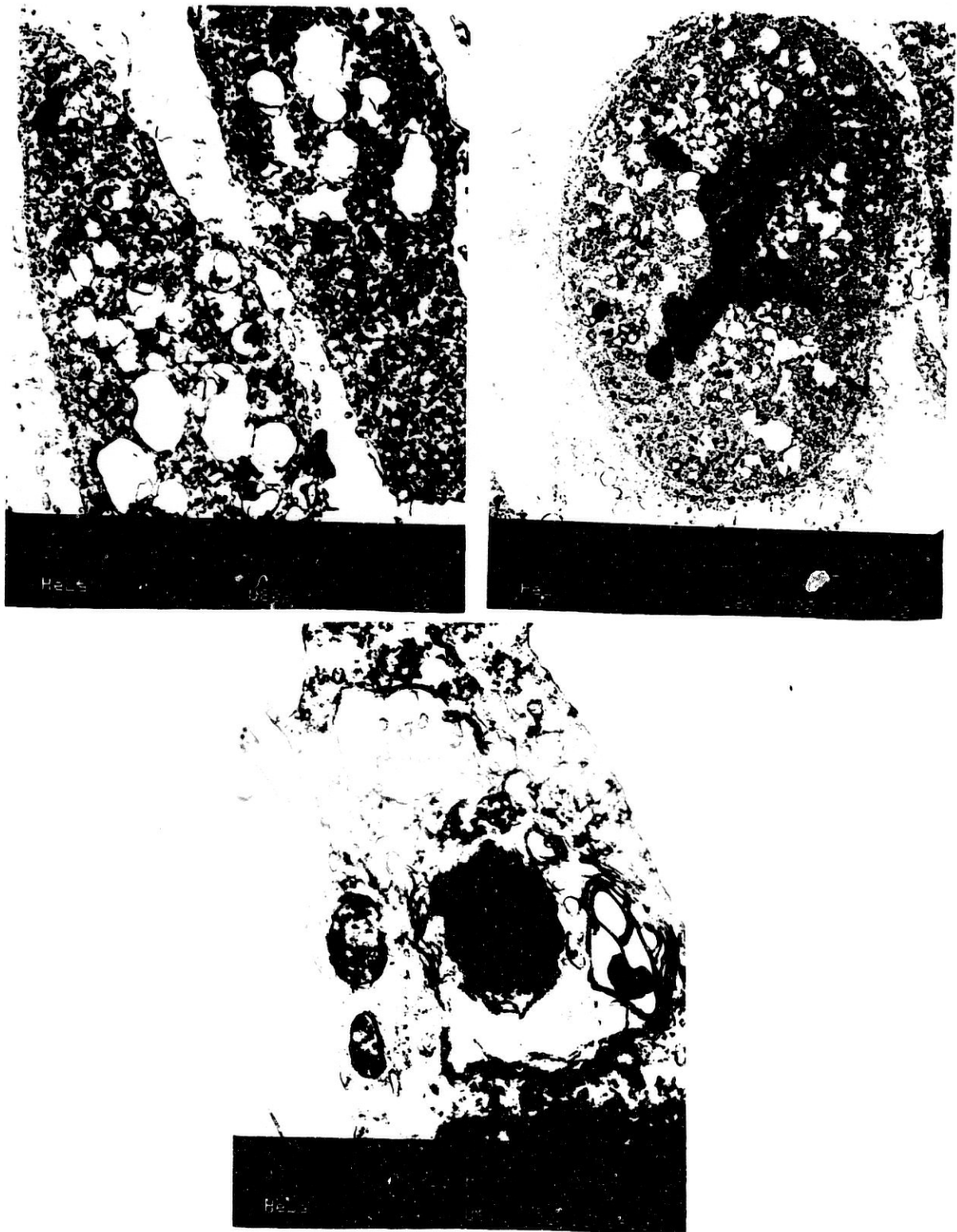


Figura nº 25. Ultraestructura de células HeLa tratadas con el derivado acídico BG-203. N= Núcleo. M= Mitocondria. P= Polisomas. C= Cromatina. V= Vacuola Lipídica. E= Fenómeno de Endocitosis. R= Retículo Endoplasmático. A= Aparato de Golgi. L= Lisosomas.



Figura nº 26. Ultraestructura de células HeLa tratadas con el derivado acridínico **BG-237**. N= Núcleo. M= Mitocondria. P= Polisomas. C= Cromatina. V= Vacuola Lipídica. E= Fenómeno de Endocitosis. R= Retículo Endoplasmático. A= Aparato de Golgi. L= Lisosomas.



**Figura nº 27.** Ultraestructura de células HeLa tratadas con el derivado acridínico BG-289. N= Núcleo. M= Mitocondria. P= Polisomas. C= Cromatina. V= Vacuola Lipídica. E= Fenómeno de Endocitosis. R= Retículo Endoplasmático. A= Aparato de Golgi. L= Lisosomas.

### 3.S.- Ensayos B'ioqu'ımicos.

Al objeto de conocer los efectos que el tratamiento de las formas promastigotas de *L. donovani* y epimastigotas de *T. cruzi* con los f'armacos seleccionados, ejerc'ian sobre la producci'ın de metabolitos y actividades enzim'aticas, se realizaron estudios de [<sup>1</sup>H] RMN, y estudios de determinaci'ın de metabolitos y actividades enzim'aticas.



### 3.S.1. Espectroscopía de [<sup>1</sup>H] Resonancia Magnética Nuclear.

Se siguió el procedimiento indicado en el 2.C.1. mostrándose los espectros resultantes en las figuras nº 28 a 31.

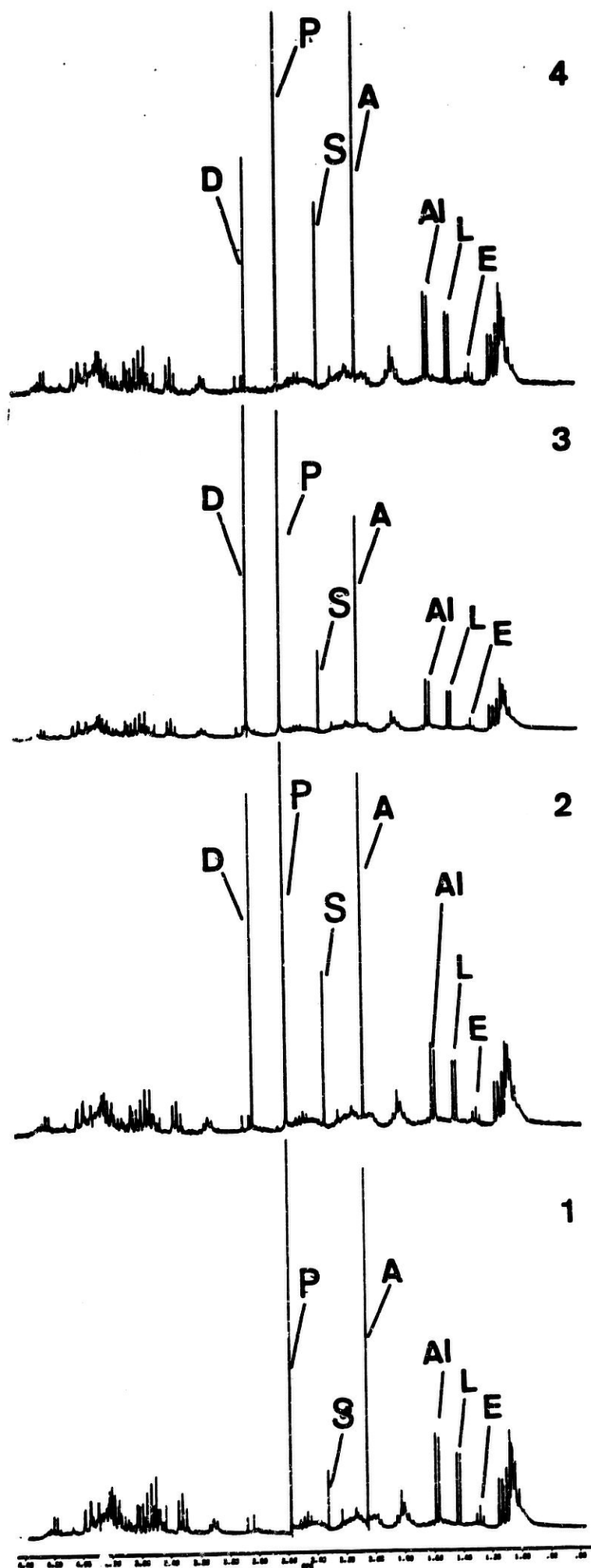


Figura nº 28. Espectros de  $^1\text{H}$  Resonancia Magnética Nuclear de formas promastigotes de *L. donovani* tratadas con los compuestos seleccionados. 1) Control -formas promastigotes no tratadas-. 2) Efecto del derivado BG-203. 3) Efecto del derivado BG-237. 4) Efecto del derivado BG-289. [D= Dimetil Sulfóxido; S= Succinato; P= Piruvato; A= Acetato; Al= Alanina; L= Lactato; E= Etanol].

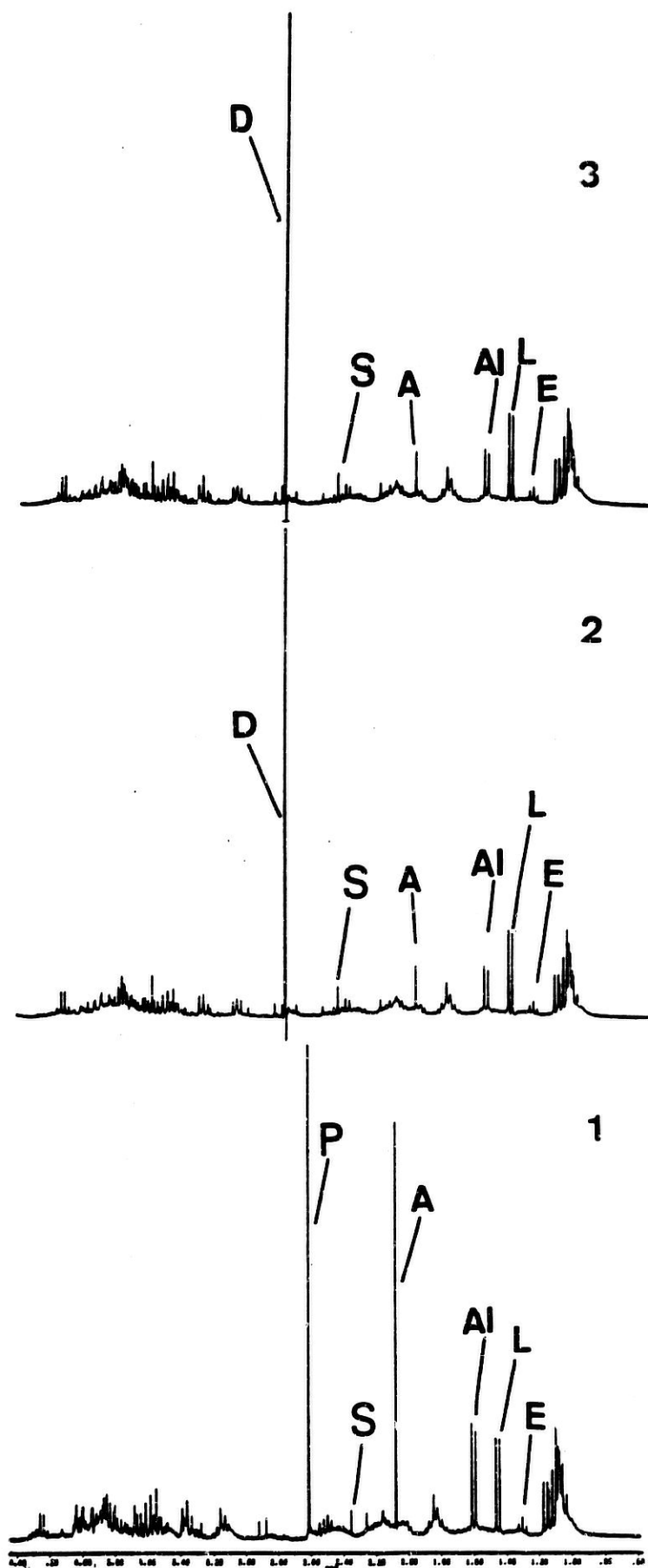


Figura nº 29. Espectros de [ $^1\text{H}$ ] Resonancia Magnética Nuclear de formas promastigotes de *L. donovani* tratadas con los compuestos seleccionados. 1) Control -formas promastigotes no tratadas-. 2) Efecto del complejo  $\text{Rh}^{\text{III}}$ -Ethyxantato. 3) Efecto del ligando Ethyxantato de  $\text{K}^+$ . [D= Dimetil Sulfóxido; S= Succinato; P= Piruvato; A= Acetato; Al= Alanina; L= Lactato; E= Etanol].

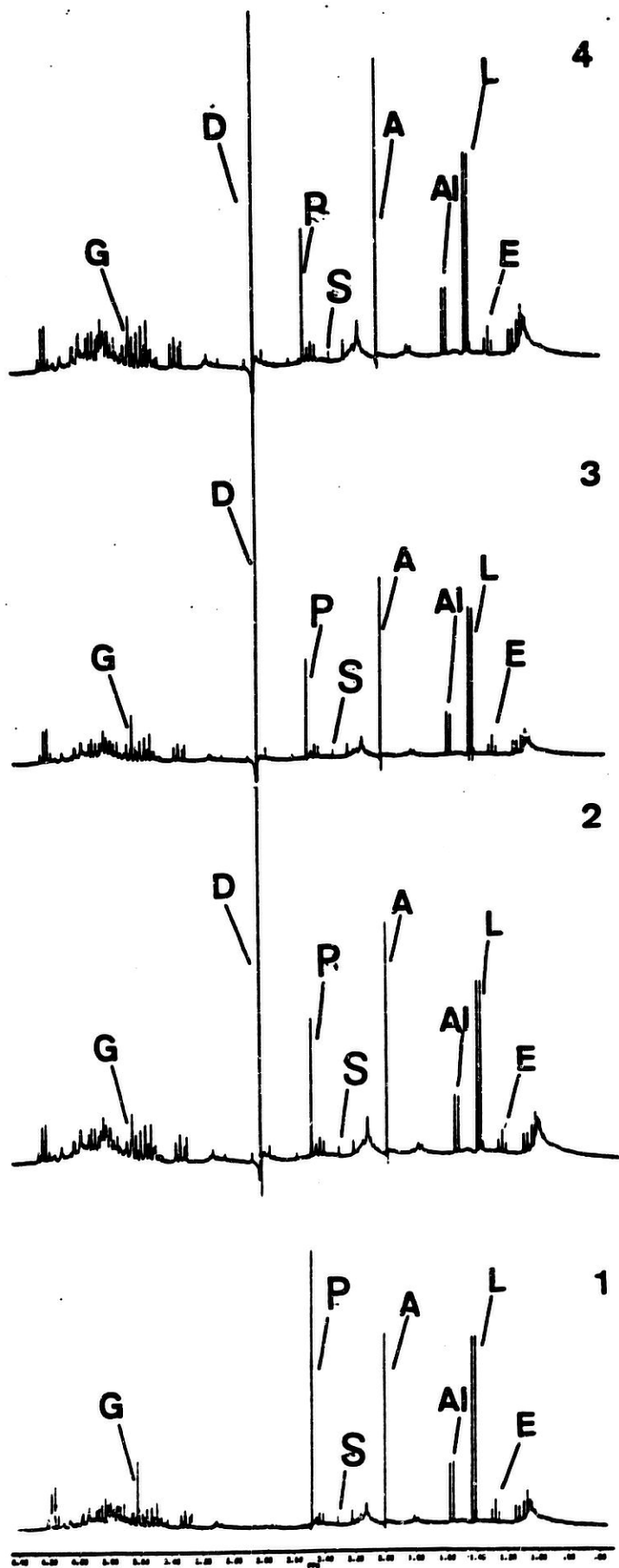


Figura nº 30. Espectros de  $[^1\text{H}]$  Resonancia Magnética Nuclear de formas epimastigotes de *T. cruzi* tratadas con los compuestos seleccionados. 1) Control -formas epimastigotes no tratadas-. 2) Efecto del derivado BG-203. 3) Efecto del derivado BG-237. 4) Efecto del derivado BG-289. [D= Dimetil Sulfóxido; S= Succinato; P= Piruvato; A= Acetato; Al= Alanina; L= Lactato; E= Etanol; G= Glicina].

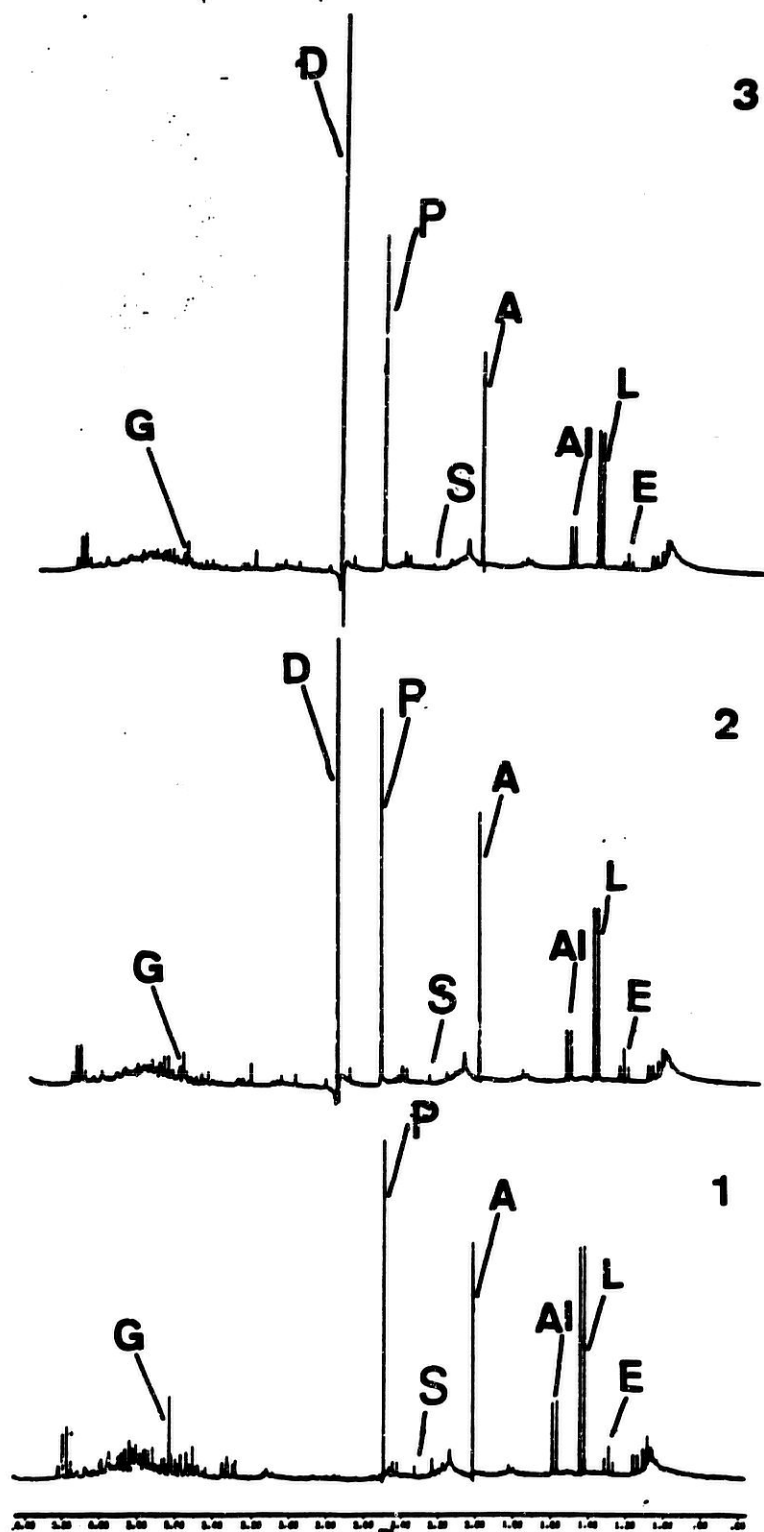


Figura nº 31. Espectros de [<sup>1</sup>H] Resonancia Magnética Nuclear de formas epimastigotes de *T. cruzi* tratadas con los compuestos seleccionados. 1) Control -formas epimastigotes no tratadas-. 2) Efecto del complejo Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato. 3) Efecto del ligando Ethylxantato de K<sup>+</sup>.

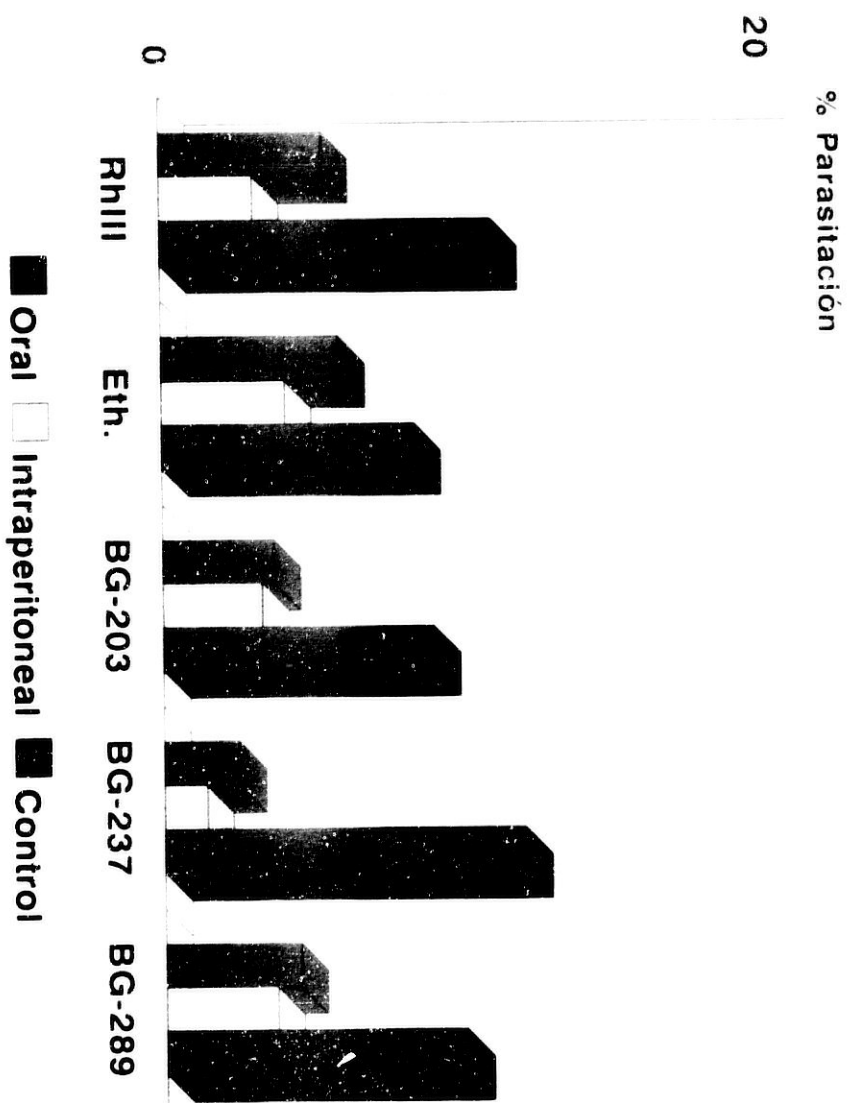
[D= Dimetil Sulfóxido; S= Succinato; P= Piruvato; A= Acetato; Al= Alanina; L= Lactato; E= Etanol; G= Glicina].

**3.T.- Estudios de la actividad antiparasitaria "in vivo".**

**3.T.1. Pruebas "in vivo" frente a *L. donovani*.**

El procedimiento seguido es el indicado en el apartado 2.E.1., mostrándose los resultados en las Tablas 104 y 105.

## Disminución de la parasitación ejercida por los compuestos



**3.T.2. Pruebas "in vivo" frente a *T. cruzi*.**

El procedimiento seguido es el indicado en el apartado 2.E.2., siendo los resultados obtenidos los indicados en las Tablas 106 a 111.



Sangre del 49 día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 00.00          | 00.00      | 01.19     | 01.34      | 01.76        |
| 7           | 05.41          | 00.00          | 01.08      | 01.79     | 03.31      | 04.16        |
| 10          | 18.61          | 02.21          | 03.65      | 05.59     | 08.76      | 09.98        |
| 14          | 31.42          | 04.24          | 06.78      | 08.66     | 10.15      | 13.76        |
| 20          | 34.44          | 07.97          | 10.12      | 13.65     | 16.64      | 16.87        |

Sangre del 72 día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 00.00          | 00.00      | 01.13     | 01.23      | 01.70        |
| 7           | 05.41          | 00.00          | 00.14      | 01.19     | 03.00      | 03.97        |
| 10          | 18.61          | 02.00          | 02.65      | 04.13     | 07.34      | 08.88        |
| 14          | 31.42          | 04.12          | 05.16      | 08.06     | 09.65      | 11.56        |
| 20          | 34.44          | 07.27          | 07.34      | 10.15     | 16.09      | 16.80        |

Sangre del 142 día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 00.00          | 00.00      | 00.56     | 01.10      | 01.70        |
| 7           | 05.41          | 00.00          | 00.00      | 00.65     | 02.56      | 03.09        |
| 10          | 18.61          | 01.96          | 02.05      | 03.41     | 05.24      | 06.88        |
| 14          | 31.42          | 03.12          | 03.76      | 05.78     | 09.41      | 09.86        |
| 20          | 34.44          | 05.32          | 06.79      | 08.91     | 10.00      | 14.87        |

Sangre del 21<sup>er</sup> día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 00.00          | 00.00      | 00.21     | 00.98      | 01.65        |
| 7           | 05.41          | 00.00          | 00.00      | 00.45     | 01.97      | 02.76        |
| 10          | 18.61          | 01.56          | 01.98      | 02.35     | 03.14      | 06.74        |
| 14          | 31.42          | 03.00          | 02.87      | 04.00     | 08.97      | 09.50        |
| 20          | 34.44          | 05.30          | 06.81      | 07.98     | 09.21      | 14.15        |

Tabla 106: efecto del compuesto Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato sobre ratones parasitados por *T. cruzi*. Los resultados se expresan en n° de parásitos/ml de sangre. [DE=Dosis Efectiva; MDE=Máxima Dosis Efectiva; mDE=mínima Dosis Efectiva].

Sangre del 4º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.26          | 01.32      | 01.47     | 01.49      | 01.47        |
| 7           | 05.41          | 01.28          | 01.29      | 01.76     | 02.49      | 03.29        |
| 10          | 18.61          | 02.56          | 03.14      | 05.19     | 12.81      | 17.16        |
| 14          | 31.42          | 03.87          | 05.98      | 06.21     | 19.84      | 30.28        |
| 20          | 43.46          | 05.19          | 07.91      | 09.18     | 26.15      | 33.47        |

Sangre del 7º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.26          | 01.32      | 01.47     | 01.49      | 01.47        |
| 7           | 05.41          | 00.34          | 00.87      | 01.28     | 01.47      | 02.86        |
| 10          | 18.61          | 02.31          | 03.01      | 04.19     | 08.99      | 12.31        |
| 14          | 31.42          | 02.36          | 03.28      | 04.21     | 12.47      | 16.38        |
| 20          | 43.46          | 03.18          | 04.19      | 05.94     | 17.18      | 24.32        |

Sangre del 14º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.26          | 01.32      | 01.47     | 01.49      | 01.47        |
| 7           | 05.41          | 00.16          | 00.38      | 00.41     | 00.47      | 01.16        |
| 10          | 18.61          | 00.34          | 00.74      | 01.18     | 01.23      | 03.10        |
| 14          | 31.42          | 00.58          | 00.91      | 01.30     | 01.31      | 06.17        |
| 20          | 43.46          | 00.91          | 00.92      | 01.01     | 02.04      | 07.34        |

Sangre del 21º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 00.00          | 00.00      | 00.17     | 00.20      | 00.46        |
| 7           | 05.41          | 00.17          | 00.19      | 00.40     | 00.71      | 00.91        |
| 10          | 18.61          | 00.27          | 00.41      | 00.47     | 00.91      | 02.91        |
| 14          | 31.42          | 00.34          | 00.70      | 00.91     | 01.18      | 04.19        |
| 20          | 43.46          | 00.36          | 00.80      | 01.00     | 01.81      | 07.14        |

Tabla 107: efecto del ligando Ethylxantato de K<sup>+</sup> sobre ratones parasitados por *T. cruzi*. Los resultados se expresan en n<sup>o</sup> de parásitos/ml de sangre. [DE=Dosis Efectiva; MDE=Máxima Dosis Efectiva; mDE=mínima Dosis Efectiva].

Sangre del 4º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.26          | 01.32      | 01.47     | 01.49      | 01.47        |
| 7           | 05.41          | 01.70          | 01.78      | 02.71     | 03.18      | 04.84        |
| 10          | 18.61          | 3.81           | 5.13       | 7.42      | 10.28      | 17.42        |
| 14          | 31.42          | 5.84           | 9.32       | 12.13     | 19.23      | 27.81        |
| 20          | 34.44          | 5.99           | 11.38      | 16.21     | 19.48      | 27.83        |

Sangre del 7º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.26          | 01.32      | 01.47     | 01.49      | 01.47        |
| 7           | 05.41          | 00.59          | 01.31      | 01.36     | 02.19      | 03.84        |
| 10          | 18.61          | 02.46          | 03.01      | 03.67     | 08.46      | 15.98        |
| 14          | 31.42          | 03.18          | 05.29      | 05.91     | 12.34      | 18.19        |
| 20          | 43.46          | 04.25          | 06.84      | 07.64     | 15.15      | 20.41        |

Sangre del 14º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.26          | 01.32      | 01.47     | 01.49      | 01.47        |
| 7           | 05.41          | 00.23          | 00.47      | 00.71     | 01.19      | 01.39        |
| 10          | 18.61          | 00.39          | 00.71      | 00.84     | 01.34      | 01.81        |
| 14          | 31.42          | 00.51          | 00.84      | 00.91     | 00.94      | 01.24        |
| 20          | 43.46          | 00.64          | 00.91      | 01.30     | 01.30      | 01.32        |

Sangre del 21º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.26          | 01.32      | 01.47     | 01.49      | 01.47        |
| 7           | 05.41          | 00.18          | 00.18      | 00.41     | 00.49      | 00.71        |
| 10          | 18.61          | 00.21          | 00.60      | 00.71     | 01.18      | 01.21        |
| 14          | 31.42          | 00.32          | 00.61      | 00.92     | 01.00      | 01.00        |
| 20          | 43.46          | 00.33          | 00.64      | 01.98     | 01.10      | 01.10        |

Tabla 108: efecto del compuesto BG-203 sobre ratones parasitados por *T. cruzi*. Los resultados se expresan en n° de parásitos/ml de sangre. [DE=Dosis Efectiva; MDE=Máxima Dosis Efectiva; mDE=mínima Dosis Efectiva].



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART  
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS  
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a  
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

Sangre del 4º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.26          | 01.32      | 01.47     | 01.49      | 01.47        |
| 7           | 05.41          | 01.70          | 01.78      | 02.71     | 03.18      | 04.84        |
| 10          | 18.61          | 3.81           | 5.13       | 7.42      | 10.28      | 17.42        |
| 14          | 31.42          | 5.84           | 9.32       | 12.13     | 19.23      | 27.81        |
| 20          | 34.44          | 5.99           | 11.38      | 16.21     | 19.48      | 27.83        |

Sangre del 7º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.26          | 01.32      | 01.47     | 01.49      | 01.47        |
| 7           | 05.41          | 00.59          | 01.31      | 01.36     | 02.19      | 03.84        |
| 10          | 18.61          | 02.46          | 03.01      | 03.87     | 08.46      | 15.98        |
| 14          | 31.42          | 03.18          | 05.29      | 05.91     | 12.34      | 18.19        |
| 20          | 43.46          | 04.29          | 06.84      | 07.84     | 15.15      | 20.41        |

Sangre del 14º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.26          | 01.32      | 01.47     | 01.49      | 01.47        |
| 7           | 05.41          | 00.23          | 00.47      | 00.71     | 01.19      | 01.39        |
| 10          | 18.61          | 00.39          | 00.71      | 00.84     | 01.34      | 01.81        |
| 14          | 31.42          | 00.51          | 00.84      | 00.91     | 00.94      | 01.24        |
| 20          | 43.46          | 00.64          | 00.91      | 01.30     | 01.30      | 01.32        |

Sangre del 21º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.26          | 01.32      | 01.47     | 01.49      | 01.47        |
| 7           | 05.41          | 00.18          | 00.18      | 00.41     | 00.49      | 00.71        |
| 10          | 18.61          | 00.21          | 00.60      | 00.71     | 01.18      | 01.21        |
| 14          | 31.42          | 00.32          | 00.61      | 00.92     | 01.00      | 01.00        |
| 20          | 43.46          | 00.33          | 00.64      | 01.98     | 01.10      | 01.10        |

Tabla 108: efecto del compuesto BG-203 sobre ratones parasitados por *T. cruzi*. Los resultados se expresan en n° de parásitos/ml de sangre. [DE=Dosis Efectiva; MDE=Máxima Dosis Efectiva; mDE=mínima Dosis Efectiva].

Sangre del 4º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.26          | 01.32      | 01.47     | 01.49      | 01.47        |
| 7           | 05.41          | 01.28          | 01.29      | 01.76     | 02.49      | 03.29        |
| 10          | 18.61          | 02.56          | 03.14      | 05.19     | 12.81      | 17.16        |
| 14          | 31.42          | 03.87          | 05.98      | 06.21     | 19.84      | 30.28        |
| 20          | 43.46          | 05.19          | 07.91      | 09.18     | 26.15      | 33.47        |

Sangre del 7º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.26          | 01.32      | 01.47     | 01.49      | 01.47        |
| 7           | 05.41          | 00.34          | 00.87      | 01.28     | 01.47      | 02.86        |
| 10          | 18.61          | 02.31          | 03.01      | 04.19     | 08.99      | 12.31        |
| 14          | 31.42          | 02.36          | 03.28      | 04.21     | 12.47      | 16.38        |
| 20          | 43.46          | 03.18          | 04.19      | 05.94     | 17.18      | 24.32        |

Sangre del 14º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.26          | 01.32      | 01.47     | 01.49      | 01.47        |
| 7           | 05.41          | 00.16          | 00.38      | 00.41     | 00.47      | 01.16        |
| 10          | 18.61          | 00.34          | 00.74      | 01.18     | 01.23      | 03.10        |
| 14          | 31.42          | 00.58          | 00.91      | 01.30     | 01.91      | 06.17        |
| 20          | 43.46          | 00.91          | 00.92      | 01.01     | 02.04      | 07.34        |

Sangre del 21º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 00.00          | 00.00      | 00.17     | 00.20      | 00.46        |
| 7           | 05.41          | 00.17          | 00.19      | 00.40     | 00.71      | 00.91        |
| 10          | 18.61          | 00.27          | 00.41      | 00.47     | 00.91      | 02.91        |
| 14          | 31.42          | 00.34          | 00.70      | 00.91     | 01.18      | 04.19        |
| 20          | 43.46          | 00.36          | 00.80      | 01.00     | 01.81      | 07.14        |

Tabla 109: efecto del compuesto BG-237 sobre ratones parasitados por *T. cruzi*. Los resultados se expresan en nº de parásitos/ml de sangre. [DE=Dosis Efectiva; MDE=Máxima Dosis Efectiva; mDE=mínima Dosis Efectiva].

Sangre del 4º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.71          | 01.90      | 01.92     | 02.19      | 02.30        |
| 7           | 05.41          | 01.78          | 02.34      | 02.84     | 03.92      | 04.18        |
| 10          | 18.61          | 04.32          | 04.80      | 06.13     | 08.46      | 12.13        |
| 14          | 31.42          | 06.24          | 09.96      | 15.42     | 23.18      | 26.21        |
| 20          | 43.46          | 08.34          | 09.17      | 09.31     | 27.19      | 30.14        |

Sangre del 7º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 01.71          | 01.90      | 01.92     | 02.19      | 02.30        |
| 7           | 05.41          | 01.22          | 01.38      | 01.94     | 02.94      | 03.49        |
| 10          | 18.61          | 02.15          | 02.99      | 03.01     | 05.81      | 09.96        |
| 14          | 31.42          | 04.16          | 05.11      | 05.17     | 06.48      | 10.21        |
| 20          | 43.46          | 04.32          | 05.39      | 05.58     | 07.11      | 12.81        |

Sangre del 14º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 00.41          | 00.42      | 01.68     | 02.00      | 02.16        |
| 7           | 05.41          | 00.67          | 00.71      | 00.89     | 01.18      | 02.82        |
| 10          | 18.61          | 00.81          | 00.92      | 00.97     | 01.01      | 03.51        |
| 14          | 31.42          | 01.16          | 01.31      | 01.42     | 01.51      | 05.18        |
| 20          | 43.46          | 01.18          | 02.16      | 02.18     | 03.16      | 07.21        |

Sangre del 21º día

| <u>DIAS</u> | <u>CONTROL</u> | <u>10 x DE</u> | <u>MDE</u> | <u>DE</u> | <u>mDE</u> | <u>DE/10</u> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-----------|------------|--------------|
| 0           | 0              | 0              | 0          | 0         | 0          | 0            |
| 4           | 02.32          | 00.31          | 00.49      | 00.49     | 01.18      | 02.01        |
| 7           | 05.41          | 00.37          | 00.51      | 00.53     | 01.04      | 02.17        |
| 10          | 18.61          | 00.47          | 00.51      | 00.81     | 00.97      | 04.18        |
| 14          | 31.42          | 00.91          | 00.97      | 01.10     | 01.10      | 04.90        |
| 20          | 43.46          | 00.97          | 01.04      | 01.17     | 01.19      | 04.91        |

Tabla 110: efecto del compuesto BG-289 sobre ratones parasitados por *T. cruzi*. Los resultados se expresan en n° de parásitos/ml de sangre. [DE=Dosis Efectiva; MDE=Máxima Dosis Efectiva; mDE=mínima Dosis Efectiva].

## **4.- DISCUSION**



## 4.- DISCUSION

El desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios implica, en una primera etapa, el diseño de estructuras químicas adecuadas, su síntesis, el estudio de las propiedades químicas y biológicas que relacionen su potencial actividad antiparasitaria y su toxicidad. Sólo las sustancias que satisfagan los requerimientos de seguridad son sometidas a ensayos clínicos, y tales ensayos son diseñados para asegurar que cada droga experimente una cuidadosa evaluación antes de ser destinada al uso clínico. De las tres fases que globalmente componen el proceso -química, biológica y clínica-, el cribado primario y la evaluación preclínica constituyen los estudios biológicos, que requieren la utilización de técnicas estandarizadas para el estudio de las infecciones o infestaciones por parásitos (Escario y Gómez, 1992).

Ante la necesidad de establecer una quimioterapia eficaz frente a la leishmaniosis visceral y la enfermedad de Chagas, dada la escasa eficacia o elevada toxicidad mostrada por el empleo de fármacos convencionales, se ha evaluado el efecto desarrollado por diferentes complejos metálicos y derivados acridínicos de nueva síntesis frente a *T. cruzi* y *L. donovani* tanto "in vitro" como "in vivo".

Es sabido que determinados agentes antineoplásicos poseen actividad tripanocida "in vivo" (Kinnamon y col., 1979; Craciunescu y col., 1983; Osuna y col., 1983). Este hecho puede ser imputable a una cierta semejanza entre el metabolismo de estos parásitos y el de las células tumorales (Borst, 1977; Grady y col., 1984).

El primer objetivo de este trabajo fue el determinar los efectos de distintos compuestos sobre el crecimiento de los parásitos. En esta primera fase se utilizaron formas promastigotas de *L. donovani* y epimastigotas de *T. cruzi*. De este primer cribado, se seleccionaron una serie de complejos y derivados acridínicos en función de la inhibición del crecimiento ejercida "in vitro". Los derivados acridínicos más activos, fueron sometidos a un estudio de la alteración de la movilidad que provocaban sobre los parásitos, con el fin de llevar a cabo una mayor discriminación en la elección de los compuestos, dada la gran cantidad de ensayos que aún debían llevarse a cabo.

Los compuestos que se seleccionaron fueron, el complejo Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato, su ligando; y los derivados acridínicos BG-203 [(3NH<sub>2</sub>-9-S-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)Acridina], BG-237 [[2-metoxi-6-Cl-9-S-(2-N-dietilaminoetil)Acridina] y BG-289 [[3Cl-9S-(2-N-dietilaminoetil)Acridina].

Estos parásitos, como ya ha quedado indicado, presentan en su ciclo de vida una fase intracelular aflagelada (amastigote). El cultivo "in vitro" de amastigotes se mostraba pues importante para estudios sobre la interrelación amastigotes-macrófagos, bioquímica de amastigotes y estudios de quimioterapia. El cultivo "in vitro" de estas formas aflageladas se hace normalmente sobre macrófagos peritoneales obtenidos de ratones, cricetos y cobayas (Handman y Spira, 1977); monocitos humanos obtenidos de sangre periférica; líneas celulares de macrófagos como la J774G8 obtenida de ratón (Berens y Marr, 1979; Chang, 1980) y líneas celulares diversas con capacidad fagocítica (Mattock y Peters, 1975a,b). No obstante, la cantidad de amastigotes obtenidos por estos procedimientos, no permitían el realizar estudios bioquímicos o de quimioterapia fiables (Escario y Gomez, 1992). Los intentos de obtener cultivos axénicos de amastigotes de diferentes especies de *Leishmania* han sido numerosos (Pan 1984; Smejkal y col. 1984; Van der Ploeg y col. 1985; Darling y Blum 1987; Stinson y col. 1989). Según la mayor parte de los autores la transformación "in vitro" a formas amastigotas ocurre cuando los parásitos se someten a un cambio brusco de temperatura, encontrándose en las formas obtenidas similitudes antigénicas y morfológicas entre los amastigotes intracelulares y las formas obtenidas "in vitro" (Pan, 1986; Smejkal y col., 1988; Eperon y McMahon-Pratt, 1989a,b).

Recientemente Doyle y col. (1991) trabajando con *Leishmania donovani* habían encontrado la posibilidad de mantener cultivos axénicos continuos de las formas aflageladas cultivándolas a 37 °C en un 100% de suero bovino fetal, consiguiendo la reversibilidad a formas flageladas cuando disminuyen la temperatura a 28°C. No obstante la transferencia a un medio semidefinido induce la muerte del protozoo (Doyle y col., 1991).

Por este motivo intentamos la obtención de formas amastigotas de *T. cruzi* y *L. donovani*, al objeto de obtener cantidades suficientes como para llevar a cabo estudios quimioterápicos fiables, que completaran los análisis frente a todas las formas del ciclo de vida de los parásitos.

Se conocen hoy día algunos medios químicamente definidos que nos permiten cultivar "in vitro" formas promastigotas de *Leishmania* y formas epimastigotas y metacíclicas de *T. cruzi*; lo que ha permitido que se conozcan peculiaridades metabólicas de estas formas de los parásitos. Sin embargo, hay muy pocos artículos que describan un medio químicamente definido capaz de soportar el crecimiento "in vitro" de formas amastigotas (Kar y col., 1990), lo que ha hecho que estas formas aflageladas no sean perfectamente conocidas. Los conocimientos que se poseen sobre este tema, como ha quedado indicado anteriormente, se basan en formas aisladas de células previamente infectadas.

La transformación de promastigotes en amastigotes de *Leishmania* ocurre durante la fagocitosis por los macrófagos del hospedador, cuando se exponen al ambiente ácido del fagolisosoma (Chang y col., 1985). Sin embargo se desconocen actualmente los factores biológicos y químico-físicos exactos, implicados en esta transformación (Kar y col., 1990).

Algunos autores piensan que el pH puede jugar un papel importante en los mecanismos que disparan el proceso de transformación. En este sentido Zilberstein y col. (1991) apuntan que un ligero descenso del pH dispara la transformación de promastigotes a amastigotes, para *Leishmania*. Por el contrario otros autores opinan que un incremento de la temperatura de los cultivos axénicos de 26°C a 34 °C, hace que las células sufran cambios tanto a nivel morfológico (Darling y Blum, 1987) como metabólico (Blum, 1987 y Keegan y col., 1987) respecto a la transformación de formas promastigotas de *Leishmania* en amastigotas.

Por nuestros resultados (apartados 3.A y 3.B) podemos indicar que la temperatura juega un papel importante en los mecanismos que disparan la transformación en formas amastigotas. Además, el choque térmico debe ser drástico para conseguir una adecuada tasa de transformación (Stinson y col., 1989), lo cual justificaría el hecho de que cuando se someten a un cambio térmico suave, los promastigotes de *Leishmania major* experimenten pocos cambios en su morfología celular (Shapira y col., 1988 y Zilberstein y col., 1991). El hecho de que el descenso drástico de la temperatura del medio de cultivo dispare nuevamente el mecanismo de transformación en el sentido de formas amastigotas a promastigotas para *L. donovani*, o de amastigotas en formas flageladas similares a epimastigotas en el caso de *T. cruzi*, nos confirma que la temperatura es uno de los factores involucrados en el fenómeno.

Por otro lado el que la transformación se produzca cuando el medio de cultivo sufre una acidificación, originada por los metabolitos producidos y excretados por los parásitos, nos induce a pensar que el pH (o ciertos catabolitos capaces de bajar el pH, como el succinato, piruvato, fumarato, malato, etc.) debe coparticipar en el proceso; aunque este obviamente debe ser tema objeto de futuras investigaciones.

El proceso de transformación y el cambio de pH experimentado en el medio de cultivo, se recoge en las figuras nº 1 y 3. Las fotografías nº 1 y 2 muestran el proceso de transformación "in vitro" de formas promastigotas a formas amastigotas de *L. donovani*, comprobándose el

## DISCUSION

redondeamiento y pérdida de flagelo que experimentan al cultivarse a 37° C. La fotografía nº 3 muestra las distintas formas que aparecen tras dos días de cultivo a dicha temperatura. Las fotografías nº 4 y 5 muestran las formas amastigotas obtenidas de *T. cruzi*.

Las formas amastigotas de ambos parásitos, una vez obtenidas "in vitro" y cultivadas a 37° C, experimentan un crecimiento exponencial, tal y como se representa en las figuras nº 2 y 4. Este es un claro indicio de que las formas aflageladas obtenidas, no son formas degeneradas, sino que son capaces de multiplicarse activamente. No obstante, para comprobar la viabilidad de dichas formas amastigotas obtenidas "in vitro" se procedió a la realización de dos pruebas: tinción con el colorante vital naranja de acridina y estudio de la incorporación de Timidina [<sup>3</sup>H]. El incremento en las tasas de incorporación por parte de los amastigotes de *T. cruzi* y *L. donovani* que respectivamente se muestran en las figuras nº 5 y nº 6 indican la capacidad reproductiva y por consiguiente la viabilidad de dichas formas "in vitro". Así mismo, las fotografías nº 6 y 7 muestran la coloración verdosa que tras la tinción con naranja de acridina presentan las formas amastigotas obtenidas de *T. cruzi* y *L. donovani* y que indica su viabilidad. En caso de haberse tratado de formas muertas la coloración de todo el parásito hubiera sido amarilla.

Estos criterios, junto con la capacidad de supervivencia de estas formas en el interior de los macrófagos peritoneales no sensibilizados (figura nº 9), demuestran claramente la viabilidad y capacidad de supervivencia en su ambiente natural, capaz de destruir cualquier forma no viable. De hecho la forma de infección de nuevas células en el interior del hospedador vertebrado, ocurre por la fagocitosis llevada a cabo por las células, de las formas amastigotas intracelulares liberadas de una célula infectada previamente.

Los estudios de microscopía electrónica de estas formas amastigotas, obtenidas "in vitro" mediante cambio brusco de la temperatura de cultivo, revelan la existencia de una ultraestructura semejante a la que se ha descrito para los amastigotes aislados de macrófagos infectados (Chang, 1980). Se observa (fotografías nº 9 y nº 10) la presencia de núcleos claramente visibles, kinetoplasto y vacuolas lipídicas. La mitocondria de las formas flageladas, se muestra distribuida por el citoplasma presentando numerosas crestas mitocondriales y con una matriz electrodensa. En las formas amastigotas la existencia de algunas vacuolas lipídicas podría sugerir la falta de actividad mitocondrial. Aquí, la mitocondria aparece más ensanchada y con menor número de crestas mitocondriales que la que se observa en las formas promastigotas de *L. donovani* o epimastigotas de *T. cruzi*. Numerosas cisternas y vesículas se localizan en las proximidades de la bolsa flagelar de los amastigotes de ambos parásitos. Igualmente se observan menor número de glicosomas que en los promastigotes de *L. donovani* o epimastigotes de *T. cruzi*. En la fotografía nº 9.a de las formas promastigotas de *L. donovani*, aparecen axonemas libres como consecuencia del corte transversal de los flagelos, no observándose en las preparaciones de las formas amastigotas (fotografía nº 9.b).

La fotografía nº 8 muestra la reactividad positiva que presentan las formas amastigotas de *L. donovani* obtenidas "in vitro" tras ser sometidas a una inmunofluorescencia indirecta, y que demuestra similitudes antigénicas con los amastigotes intracelulares, lo que está de acuerdo con McMahon-Pratt y col., 1987 y Eperon y McMahon-Pratt, 1989.

El metabolismo de la glucosa ha sido muy bien estudiado en promastigotes de diferentes especies de *Leishmania* y en *T. cruzi*; por el contrario, se sabe muy poco acerca de este metabolismo en las formas amastigotas, por las razones citadas con anterioridad. Hemos considerado así mismo interesante, estudiar las diferencias metabólicas que existen entre las diferentes formas flageladas y aflageladas de *L. donovani*; y de *T. cruzi*, mediante la detección de los metabolitos producidos y excretados al medio, determinados mediante resonancia magnética nuclear de [<sup>1</sup>H] (figuras nº 7 y 8);

**3.G.- Estudios de [<sup>1</sup>H] Resonancia Magnética Nuclear de las formas amastigotas de *L. donovani* obtenidas "in vitro".**

La figura nº 7 representa espectros de [<sup>1</sup>H] Resonancia Magnética Nuclear, obtenidos según se indica en el apartado 2.C.1. La imagen nº 7.i representa el espectro obtenido del medio fresco TC-199 libre de parásitos. La imagen 7.ii corresponde al espectro obtenido del medio de cultivo de formas promastigotas de *L. donovani* cultivadas a 28° C. La imagen nº 7.iii muestra el espectro resultado del análisis del medio de cultivo obtenido tras la transformación de las formas promastigotas de *L. donovani* en formas amastigotas.

llevando a cabo un estudio comparativo entre estos datos y los preexistentes en la bibliografía.

Cuando cultivamos formas promastigotas de *Leishmania donovani* en un medio TC-199, en condiciones de aerobiosis (dado que el frasco se abría diariamente), el parásito excreta al medio como metabolitos finales principalmente alanina, succinato y acetato, además de considerables cantidades de piruvato, glicina y D-lactato. En estudios anteriores realizados en diferentes especies de *Leishmania*, como *L. pifanoi* (Rainey y Mackenzie, 1991), *L. braziliensis* (Darling y col., 1987) y *L. major* (Darling y col., 1989 y Keegan y Blum, 1990), se ha visto que producen aparte de dióxido de carbono, succinato, acetato y alanina como metabolitos mayoritarios, comunes a las tres especies citadas; y como metabolitos minoritarios, dependiendo de la especie estudiada, se ha encontrado que *L. pifanoi* excreta además malato y citrato (Rainey y Mckenzie, 1991). Otros autores (Cazzulo y col., 1985 y Glew y col. 1988) no detectan la excreción de este catabolito pero sí la de piruvato. En *L. mexicana*, las formas promastigotas crecidas en medios complejos (Hart y Coombs, 1982) excretan cantidades considerables de L-alanina y glicina; mientras que en *L. major* se ha detectado la excreción de L-alanina en lugar de glicina, glicerol y lactato (Darling y col., 1989 y Keegan y Blum, 1990). Algunos de estos autores habían encontrado bajo condiciones anaeróbicas de cultivo (Darling, Balber y Blum, 1988) que las principales especies de *Leishmania* excretaban D-lactato. Nosotros bajo nuestras condiciones experimentales hemos observado que el succinato es excretado al medio por las formas promastigotas de *Leishmania donovani*. Este succinato puede proceder bien del piruvato vía oxalacetato-malato-fumarato, o por la vía del glioxilato, vía que se ha demostrado como funcional en diversas especies de *Leishmania* (Simon y col., 1978).

También son excretados por las formas promastigotas de *Leishmania donovani* alanina y acetato. La Alanina, al parecer procede del piruvato, necesitando para esta conversión una fuente suministradora de nitrógeno. Esto confirma el catabolismo de los aminoácidos en *Leishmania*.

El conocimiento sobre la excreción de metabolitos finales de las formas amastigotas de *T. cruzi* y *Leishmania* (Glew y col., 1988), como antes apuntábamos, es escaso. Diversos autores (Hart y Coombs, 1982; Hart y Opperdoes, 1984) piensan que en las formas promastigotas de algunas especies de *Leishmania*, la glucólisis es más importante desde un punto de vista energético que en las formas amastigotas. Las evidencias en las que se apoyan son, que bajo condiciones de aerobiosis las formas promastigotas producen cantidades considerablemente más altas de dióxido de carbono, y en la existencia en los promastigotes de un mayor número de glicosomas por célula, que en los amastigotes. Según Blum (1987) las formas amastigotas utilizan mayoritariamente como fuente carbonada los ácidos grasos y en menor proporción la glucosa.

Las formas amastigotas de *Leishmania mexicana* excretan succinato, acetato, alanina (Hart y Coombs, 1982) y malato (Rainey y Mackenzie ;1991) como metabolitos finales. Nosotros en nuestro estudio hemos detectado en *L. donovani*, alanina, acetato, glicina, y en menor cantidad succinato, piruvato y D-lactato. El hecho de que en los medios de cultivo de formas amastigotas aparezcan succinato y piruvato en pequeña proporción, podría deberse a catabolitos de las formas de transición promastigotas-amastigotas producidos durante la evolución de estas últimas en el cultivo, en lugar de proceder de las formas amastigotas. Lo que nos sugiere que la vía metabólica de las formas aflageladas que convierte al succinato (vía malato y fumarato), es menos funcional que en las formas promastigotas.

El aumento de los niveles de producción de alanina, acetato y glicina confirmaría la idea expuesta anteriormente, de que en las formas amastigotas de *L. donovani* el catabolismo de los ácidos grasos es uno de los mecanismos fundamentales para la producción de energía, al menos bajo nuestras condiciones experimentales.

Estudios previos utilizando RMN<sup>[13C]</sup> en miembros del género *Trypanosoma* (Mackenzie y col., 1982, 1983), indican que el piruvato es el único producto final de la glucólisis bajo condiciones aeróbicas, y que el glicerol y el piruvato son producidos bajo condiciones anaeróbicas. Cannata y Cazzulo (1984) observan que en las formas epimastigotas de *T. cruzi*, en cultivo aerobio, se produce lactato, piruvato, acetato y succinato; y bajo condiciones anaerobias de cultivo, se observa un apreciable incremento en la producción de succinato, lactato y piruvato; bajando los niveles de acetato con respecto a las condiciones anteriores. Cuando el crecimiento se produce en presencia de oxígeno, las formas sanguíneas de *T. cruzi*, producen acetato y succinato; y en ausencia de oxígeno se incrementa la producción de succinato, permaneciendo constante los niveles de acetato (Cazzulo, 1984). Por otra parte las formas amastigotas de *T. cruzi* obtenidas "in vitro" excretan acetato como metabolito principal, seguido de glicerol, succinato, piruvato y glicina. A diferencia de las formas epimastigotas, estas formas no producen L-alanina.

Se corrobora pues, que el metabolismo de estas formas obtenidas "in vitro" a 37° C muestra diferencias con respecto al de las formas epimastigotas y metacíclicas de *T. cruzi*; al igual que se deduce de los datos citados con anterioridad para *L. donovani*.

Dada la necesidad de evaluar sobre *T. cruzi* y *L. donovani* la acción de los derivados organometálicos y compuestos acridínicos de nueva síntesis, se han utilizado para el "screening" inicial formas epimastigotas de *T. cruzi* y promastigotas de *L. donovani*. La facilidad de su cultivo "in vitro", así como la gran capacidad de multiplicación de los parásitos, hacen que los efectos de las moléculas se puedan manifestar rápidamente.

Los resultados frente a formas epimastigotas de *T. cruzi* ya fueron mostrados en las Tablas nº 1 a 13; y frente a formas promastigotas de *L. donovani* en las Tablas nº 14 a 26.

Los complejos metálicos con Rh<sup>II</sup> y Rh<sup>III</sup> pueden constituir una alternativa a la quimioterapia antitumoral de los complejos derivados del cis-Pt(II), obteniéndose resultados efectivos con ellos frente a tumores e infecciones bacterianas (Craciunescu y col., 1983; Dehand y Jordanov, 1976). Fabretti y col., 1984; han postulado la existencia de moderada actividad antitumoral para los complejos neutros y octaédricos del tipo [Rh<sup>III</sup>(L)<sub>3</sub>]<sup>0</sup> cuando L es un derivado del ditiocarbamato.

Zinsstag y col., 1991, ensayaron complejos de Rh<sup>I</sup> y Rh<sup>III</sup> frente a formas sanguíneas de *Trypanosoma b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* y *T. b. brucei*. La sensibilidad mostrada por estas especies fue similar frente a los complejos. La mayor inhibición en el crecimiento se producía con aquellos compuestos del Rh<sup>I</sup> ligado a pentamidina, y los de Rh<sup>III</sup> con ligandos como el Ethylxantato.

Craciunescu y col.,(1993) observaron que a medida que aumenta la carga π electrónica localizada entre los dadores de los ligandos (L), (es decir, a medida que aumenta el grado de la interacción L⇒Rh<sup>III</sup>) aumenta la actividad antitumoral "in vivo" de las estructuras octaédricas [Rh<sup>III</sup>(L)<sub>4</sub>(Cl)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> Cl<sup>-</sup>, [Rh<sup>III</sup>(L)<sub>4</sub>(Cl)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> Br<sup>-</sup> y [Rh<sup>III</sup>(L)<sub>3</sub>]<sup>0</sup>.

En un primer grupo de experiencias pudimos comprobar, como los complejos ejercen una considerable acción frente a las formas epimastigotas de *T. cruzi* y frente a las promastigotas de *L. donovani*. Se manifiesta así mismo como en aquellos derivados cuyos ligandos son ya medicamentos clásicos antiparasitarios (amodiaquina, mepacrina o primaquina) presentan una actividad superior a la de los ligandos libres; y como los derivados más efectivos son los que contienen Cl (serie A) en su estructura. Esto último coincide con lo descrito por Craciunescu y col. (1983), comprobándose así mismo como la actividad de los compuestos de Rh<sup>I</sup> ensayados es similar frente a ambos parásitos.

El complejo Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato, es el que muestra un porcentaje de inhibición del crecimiento mayor (100% a todas las concentraciones y tiempos), comprobándose como cuando es sustituido el ligando por otro ligando aniónico bidentado derivado del xantato, el complejo pierde totalmente la actividad. Estos datos coinciden con los aportados por Zinsstag y col, 1991; y por Craciunescu y col., (1990) para complejos de Rh<sup>III</sup> frente a *T. cruzi*.

Así mismo, el complejo Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato ha sido el más activo de todos los complejos metálicos ensayados por nosotros en el presente trabajo, tanto frente a formas promastigotas de *L. donovani* como frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*. Sin embargo, al analizar la actividad del ligando libre (Tablas 12 y 25) se comprueba como para ambos parásitos el complejo muestra actividad mayor. Si bien su efectividad es mayor frente a las formas promastigotas de *L. donovani* que frente a *T. cruzi*.

Craciunescu y col., (1988, 1987, 1990) y Osuna y col., (1988) pusieron de manifiesto las interesantes actividades farmacológicas duales "in vivo" (antitumorales y antitripanosómicas) existentes en el caso de los complejos neutros o catiónicos del Ir<sup>I</sup>, Ir<sup>II</sup> e Ir<sup>IV</sup>. Mesa Valle (1991) obtuvo una alta efectividad frente a *L. donovani* por parte de compuestos de Ir<sup>III</sup>, destacando el Ir<sup>III</sup> anilinditiocarbamato y el Ir<sup>III</sup> butilxantato.

Los compuestos de Ir<sup>I</sup> ensayados por nosotros (Tablas 5 y 17), corresponden a la fórmula general  $[\text{Ir}^{\text{I}}_2]^{2+} 2 \text{X}^-$ , siendo X el monoanión correspondiente en cada caso. De los compuestos ensayados frente a formas epimastigotas de *T. cruzi* (Tabla 5), destaca el Ir<sup>I</sup>-Pentamidina-Benzylorange, que alcanza el 74.9% de inhibición del crecimiento a la concentración de 10 µg/ml a las 24 horas, alcanzando un 82.4 % a las 72 horas. Salvo este compuesto, los seis restantes complejos ensayados, llevaban el ligando diolefínico 1,5 ciclooctadieno (COD), siendo de estos el más efectivo el Ir<sup>I</sup>-COD-5,7-Dibromoxine que supera el 71,1% de inhibición del crecimiento a las 24 horas a 100 µg/ml. En el caso de los ensayos frente a *L. donovani* (Tabla n° 18), destaca el Ir<sup>I</sup>-COD-Pyrolidinditiocarbamato, con una actividad superior al 70% a todas las concentraciones y tiempos ensayados. Destaca en este caso la casi nula actividad del Ir(I)-COD-Primaquine-Etilfumarato a diferencia de lo que ocurre frente a las formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Los complejos de Ir<sup>III</sup> ensayados (Tablas n° 6 y 19), son de estructura general  $[\text{Ir}^{\text{III}} (\text{L})_4 (\text{X})_2]^+$  X<sup>-</sup>; siendo X=Cl<sup>-</sup> o Br<sup>-</sup>. Entre estos compuestos destaca el Ir<sup>III</sup>-Ethylxantato, con una inhibición del crecimiento del 100% frente a ambos parásitos, a todos los tiempos y concentraciones; con actividad superior a la mostrada por el ligando libre (Tablas n° 12 y 25).

En cuanto a los complejos de Ir<sup>IV</sup>, se trata de sales complejas del anión  $[\text{Ir}^{\text{IV}} \text{Cl}_6]^{2-}$  de estructura general  $[\text{Ir}^{\text{IV}} \text{Cl}_6] (\text{LH}_2)$ , en donde LH<sub>2</sub><sup>2+</sup> es la estilbamidina diprotonada ó LH el Benznidazole monoprotonado (RO). Ambos complejos presentan una inhibición del crecimiento parecida frente a las formas epimastigotas de *T. cruzi* (Tabla 7); si bien en el caso de las formas promastigotas de *L. donovani* (Tabla 20), la actividad del Ir(IV)-Cl-Stilbamidina es muy superior a la del Ir(IV)-RO (que es prácticamente nula).

Los complejos de Pt<sup>II</sup> ensayados (Tablas n° 8 y 21) son complejos cuadrado-planos de simetría molecular "cis" y con estructura general Cis-Pt<sup>II</sup> (L) (Cl)<sub>2</sub>. Filardi y col. (1978) comprobaron el efecto preventivo del Cis-DDP sobre bancos de sangre infectados por *T. cruzi*; planteando el hecho de que la acción de este compuesto podría verse incrementada al mejorar la captación del complejo por parte de *T. cruzi* (es decir, al utilizar como ligandos moléculas de rápida absorción a través de la membrana celular, o grupos funcionales que facilitan la captación por la célula, tales como los derivados de la

## DISCUSION

piperacina, el tiazol, la antipirina y otros heterociclos conteniendo un átomo de Nitrógeno). Mesa-Valle (1991) con complejos de estructura similar, no encuentra en sus ensayos una gran actividad "in vitro" frente a *L. donovani*. En nuestro caso destaca la acción del Pt<sup>II</sup>-Br-RO que alcanza más del 45% de inhibición del crecimiento frente a ambos parásitos, a las 24 horas a la concentración de 100 µg/ml; llegando al 99 % a la concentración de 100 µg/ml y a las 72 horas de tratamiento. Las características del ligando, hacen que estos resultados coincidan con lo ya indicado por Filardi y col. en 1978.

En relación con los compuestos de Pt<sup>IV</sup>, los resultados se muestran en las Tablas nº 9 y 22. Son sales complejas de fórmula general [Pt<sup>IV</sup> Br<sub>6</sub>]<sup>2-</sup> (LH<sup>+</sup>)<sub>2</sub>, en donde LH es el ligando monoprotonado. De los resultados obtenidos por nosotros, se comprueba que la actividad es mayor cuando el ligando es el Br-RO (salvo para las formas promastigotas de *L. donovani*, que a las 24 horas no se observa inhibición de crecimiento). Destaca la acción del Pt<sup>IV</sup>-Br-Metamidium que si bien no alcanza más que una inhibición del crecimiento inferior al 50% frente a *T. cruzi*, a 100µg/ml y a las 72 horas; frente a formas promastigotas de *L. donovani* supera el 80 % de inhibición del crecimiento ya a las 48 horas y a la concentración de 10 µg/ml.

Los resultados de la inhibición del crecimiento ejercida por los compuestos de Ru<sup>III</sup> y Os<sup>III</sup>, se muestran en las Tablas nº 10, 11; 23 y 24. Craciunescu y col (1988), comprobaron como los complejos de estructura Os<sup>III</sup> (L)<sub>3</sub>, presentan una actividad antitumoral mayor que los complejos de Ru<sup>III</sup>(L)<sub>3</sub>; siempre y cuando la comparación se haga ligando a ligando, es decir ditiocarbamato ligado a Os<sup>III</sup> ó Ru<sup>III</sup>, y xantato ligado a Os<sup>III</sup> ó Ru<sup>III</sup>. Los complejos de Os<sup>III</sup> y del Ru<sup>III</sup> con ligando L=ditiocarbamato son más activos que los correspondientes complejos donde L es un derivado de xantato. Los resultados obtenidos por nosotros coinciden con todo lo indicado anteriormente. Entre los complejos ensayados destaca el Ru<sup>III</sup>-Primaquine frente a *T. cruzi* y *L. donovani*, superando el 96 % de inhibición del crecimiento de formas epimastigotas de *T. cruzi* a las 24 horas a 100 µg/ml. Destaca asimismo el Ru<sup>III</sup>-Benzimidazol, y el Ru<sup>III</sup>-4-Nitrotizazol, para las formas promastigotas de *L. donovani*. Entre los compuestos ensayados es de destacar el Os<sup>III</sup>-2,4-Dinitroimidazolditiocarbamato que alcanza el 60% de inhibición del crecimiento de ambos parásitos a 100 µg/ml y a las 24 horas.

Los derivados de la 9(10)-acridinona han mostrado altas expectativas biológicas y farmacológicas, habiéndose mostrado activas frente a un amplio rango de tumores experimentales, como es el caso del mieloma múltiple; o tumores del tipo andrógeno-dependiente como el carcinoma de Shionogi y la leucemia mielogénica (MacDonald y Robertson, 1966; Sroboda y col., 1966). Algunos compuestos de este tipo muestran propiedades antiparasitarias (Khalid, y col., 1986; Osuna y col., 1988) y otros han sido estudiados como potenciales agentes antibacterianos (Wu y col., 1988; Fujioka y col, 1989). A pesar de lo cual, no existe mucha bibliografía respecto a la actividad trypanocida de estos compuestos. Hasta el momento, esta actividad ha sido determinada para varios derivados acridínicos con sustitución en posición 9 (como las 9-aminoacridinas) (Firth y col., 1984; Albert, 1966), incluyendo la conocida mepacrina (Hammond y col., 1984), ledakrina y 9-acidoacridinas (Firth y col., 1984) o las 9-acridinonas (Sterling, 1977).

Por otra parte, la actividad antiprotozoaria se ha enfocado comunmente utilizando *T. brucei* (Firth y col., 1984) ó *T. cruzi* (Osuna y col., 1988) o determinando otras actividades antiparasitarias "in vitro" como la actividad antiamebiana (Osuna y col., 1987; Sharples y col., 1987). No obstante la posibilidad de obtener derivados, por modificaciones estructurales al cambiar los sustituyentes y las distintas propiedades que ello les confiere, hace que sea complejo el establecer conclusiones taxativas respecto a relaciones estructura-actividad.



Los resultados obtenidos por nosotros aparecen en las Tablas 13 y 26. Salvo los compuestos BG-530, BG-529 y BG-444 para *T. cruzi*; y BG-530, BG-529, BG-481 y BG-444 para *L. donovani*; los restantes derivados acridínicos ensayados han presentado una actividad alta o muy alta; llegando algunos a ejercer una inhibición total del crecimiento a todas las dosis y concentraciones (BG-289; BG-314; BG-498). Es por ello que con estos compuestos se plantearon los mayores problemas para seleccionar; decidiendonos después de todas las pruebas efectuadas por los denominados como BG-203; BG-237 y BG-289.

Los compuestos anteriores junto con el complejo  $Rh^{III}$ -Ethylxantato y su ligando libre (el Ethylxantato de  $K^+$ ), fueron sometidos a un estudio de la inhibición del crecimiento ejercida frente a todas las formas del ciclo de vida de ambos parásitos, a las 24, 48 y 72 horas; y a las concentraciones de 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001  $\mu g/ml$ .

Con respecto a las acridinas seleccionadas, el derivado acridínico BG-203 presenta una gradación de actividades, que para *T. cruzi* sería epimastigotes > metacíclicos > amastigotes, mientras que el complejo metálico mostró una gradación de actividades epimastigotes > amastigotes > metacíclicos. En el caso de *L. donovani* las formas amastigotas serían también las menos sensibles a la acción de las nuevas moléculas. Esta efectividad mostrada por el derivado BG-203 sería extensible así mismo para la actividad mostrada por los compuestos BG-237 y BG-289 en las diferentes formas de *T. cruzi* y de *L. donovani* frente a las que se ensayaron.

Se comprueba pues que salvo en el caso del ligando libre del complejo metálico anteriormente comentado, las formas amastigotas de ambos parásitos son las menos sensibles a la acción de los compuestos; mientras que las formas promastigotas de *L. donovani* y epimastigotas de *T. cruzi*, las que experimentan mayor inhibición; quizás como consecuencia de una mayor capacidad de multiplicación.

Al objeto de estudiar el mecanismo de acción de los compuestos seleccionados en *L. donovani* y *T. cruzi*, se estudió el efecto que tendrían sobre la biosíntesis de macromoléculas de los parásitos, tal y como se describió en Material y Métodos.

Roberts y col., (1979), llevaron a cabo estudios biológicos y bioquímicos con complejos del  $Pt^{II}$ , comprobando como se produce una modificación en la estructura secundaria del ADN que va a conducir a una inhibición en la replicación del mismo. Estos autores demostraron así mismo, como el mayor efecto se producía con complejos de isomería cis, mientras que la acción intercalante de los isómeros trans era mucho menos manifiesta tanto sobre ADN puro como como en cultivos celulares. Macquet y col. (1978), comprobaron como el cis- $Pt^{II}$  se intercala produciendo extra e intracruzamientos en la hélice del ADN. Estudios llevados a cabo por López y col., (1985) indican que la temperatura de fusión del ácido nucleico se modifica al estar en contacto con estos complejos metálicos de estructura plana, lo que pone de manifiesto la existencia de alteraciones en la estructura secundaria del ADN como consecuencia de la interacción con el producto. Ruiz-Pérez y col., (1987) observan no obstante, que el cis-DDP no altera significativamente la biosíntesis de macromoléculas en *T. cruzi*, tal vez debido a que esta sustancia tenga dificultades para atravesar la membrana del parásito.

En el caso del complejo ensayado por nosotros, hay que decir que la información de la que se dispone con relación a su modo de acción es prácticamente nula a pesar de su conocido efecto positivo sobre tumores, bacterias y parásitos (Craciunescu, 1983; Osuna y col., 1988). Girardi y col. (1974; 1977) demostraron en los complejos de  $Rh^I$  con estructura cuadrado plana, el mecanismo de acción diferente al del Neoplatín (a pesar de que su estructura es similar). Mientras que el Neoplatín induce una marcada inhibición del ADN, los complejos de  $Rh^I$ , tienen una marcada acción sobre la síntesis de proteínas.

En el caso del Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato, ensayado por nosotros, se observa que actúa inhibiendo la incorporación de todos los precursores ensayados. La inhibición del ADN, ARN y proteínas es más efectiva sobre *L. donovani* que sobre *T. cruzi*. Los datos de inhibición obtenidos para este complejo, conciben con los aportados para complejos de Rh<sup>III</sup>, por Ruiz-Pérez (1986) y Mesa-Valle (1991). Por su parte el que el ligando libre provoque así mismo, una inhibición en la incorporación de Timidina [<sup>3</sup>H], Uridina [<sup>3</sup>H] y Leucina [<sup>3</sup>H] frente a ambos parásitos, pero con un efecto menor en relación a la síntesis de proteínas que en el caso del complejo Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato, muestra una mayor actividad del complejo.

En el caso de los derivados acridínicos ensayados, si bien inhiben la síntesis de ADN, ARN y proteínas de ambos parásitos; ejercen una marcada acción sobre la incorporación de Timidina. Esto podría ser achacable a la alta capacidad intercalante que poseen este tipo de moléculas (Albert, 1966), que junto con la posible inhibición de la Topoisomerasa (Chakraborty y Majumder; 1987), enzima encargada del desenrollamiento espacial del ADN previo a la replicación y transcripción, podría explicar el efecto.

En el caso del compuesto BG-203, la inhibición que provoca en la síntesis de ADN es mayor para *T. cruzi* que para *L. donovani*, similarmente a lo que ocurre con el derivado BG-237, donde se logra una inhibición para la incorporación de Timidina [<sup>3</sup>H], que lógicamente debe reflejarse en la síntesis de ADN más intensa a igual concentración que la ejercida por el derivado BG-203. Lógicamente tras afectarse la síntesis de ADN, la transcripción y transducción se ven influenciadas. No observándose diferencias de inhibición de incorporación de Uridina en *T. cruzi* y de Leucina en *L. donovani*.

El compuesto BG-289 mostró una considerable acción inhibitoria frente a la incorporación de los tres precursores radiactivos ensayados. Mostrándose más efectivo frente a *L. donovani* que frente a *T. cruzi*.

Se podría resumir todo lo anteriormente citado indicando, que el complejo Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato ejerce una inhibición en la síntesis de ADN, ARN y proteínas similar en ambos parásitos y del mismo orden que la que ejerce el ligando. En relación con los derivados acridínicos, se podría considerar una gradación en relación a su actividad frente a la síntesis sobre todo de ADN, y también de ARN y proteínas que podría ser BG-203 > BG-237 > BG-289, existiendo una susceptibilidad ligeramente mayor en *L. donovani* que en *T. cruzi*.

Teniendo en cuenta que los experimentos llevados a cabo se realizan en un total de 135 minutos cabía pensar que la efectividad que han presentado los compuestos ensayados, podría estar en función de la mayor facilidad para atravesar la membrana de los parásitos y llegar a los lugares de acción de la Topoisomerasa tipo II (Riou y col., 1986); no pudiéndose "a priori" descartar la acción sobre otros enzimas como proteinkininas (Subramanian, y col., 1990), Oxidasas (Kou y col., 1983), Citocromo C Reductasa (Riou y col., 1986), Aldehído Deshidrogenasa (Rajaguplalan, y col., 1962), DNA-Metilasa (Riou y col., 1986), de las que se ha descrito la inhibición que sobre ellas ejercen los derivados acridínicos; y el equivalente en estos parásitos de la Glutacion Transferasa (Zollner, 1993), o con factores ribosomales que afectaran casi instantaneamente la síntesis proteica.

Al objeto de determinar el efecto citotóxico ejercido por los compuestos seleccionados, se procedió a su ensayo a diferentes concentraciones (100, 10 y 1 µg/ml) y tiempos 24, 48 y 72 horas, tal y como se indica en el apartado 2.B.2.B. Los datos obtenidos, nos permitieron realizar un estudio de las dosis más adecuadas para posteriores ensayos "in vivo". Para estos ensayos se utilizaron células de las líneas HeLa y Vero y macrófagos de las líneas J-774A.1 y RAW-264.7.

El Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato ha presentado una citotoxicidad moderada, mayor para macrófagos, y del mismo rango que el ligando libre. Estos datos coinciden con los aportados por Mesa-Valle (1991) para complejos de Rh<sup>III</sup>. Quizás estos mayores efectos pudieran deberse a variaciones en el contenido de Ca intracelular inducido por la base xántica (Osuna y col., 1990). El mecanismo de acción, al igual que el de otras bases xánticas como la teofilina o el isobutil-1-metil-xantina, pudiera ser el de inhibir la fosfodiesterasa, que a su vez va a llevar aparejado un incremento en los niveles de AMPc en el citosol y una movilización, por consiguiente, del calcio ligado a orgánulos citoplasmáticos (Brisso y Malaisse, 1973).

De los tres derivados acridínicos ensayados, el BG-237, es el que ha experimentado una citotoxicidad media mayor, seguido por el BG-203 y el BG-289. Para estos derivados, la citotoxicidad que ejercen sobre los macrófagos es considerablemente mayor que la ejercida frente a los otros tipos de poblaciones celulares.

Al objeto de estudiar la eficacia de los compuestos sobre las formas amastigotas intracelulares de *L. donovani* y de *T. cruzi*, formas que son consideradas como las más resistentes e inaccesibles a la acción de los agentes tripanocidas (Ribeiro Dos Santos y col., 1981), se realizaron una serie de experiencias sobre cultivos celulares infectados. Crane y col. (1979), y Osuna y col. (1983), demostraron que inicialmente *T. cruzi* presenta una fase de adaptación en el interior de la célula hospedadora, de aproximadamente 12 a 16 horas, durante las cuales no incorpora timidina. Tras la cual y a partir de las 36 horas, el parásito comienza una fase de multiplicación sincrónica. Al igual que las demás formas del parásito, los amastigotes difieren de las células de mamíferos, entre otros procesos metabólicos, en que almacenan tanto purinas como pirimidinas aunque el acúmulo de estas últimas sea menor (Gutteridge y Gaborak, 1977).

Estudios realizados con intercalantes del ADN como es el caso de derivados del cis-Pt<sup>II</sup> (Roberts y Thomson, 1979; Lopez y col., 1985; Craciunescu y col., 1982), han demostrado que en células tumorales el mecanismo de actuación se centra en el hecho de que el ADN es el blanco selectivo para estos compuestos, como ya ha quedado indicado, al intercalarse en la doble hélice distorsionan la estructura de esta, perturbando la transcripción y consiguiendo de esta manera alterar la biosíntesis de ADN. En función de esto, y al menos de una manera teórica, estos intercalantes del ADN deben actuar preferentemente sobre las células parasitadas, por el hecho de que no solamente existe una replicación del ADN celular sino que el parásito inicia una fase de multiplicación aún más activa que la propia célula. Por otra parte y en lo que a las células parasitadas por *T. cruzi* se refiere, existe un claro aumento de los niveles de ADN celular (Osuna y col., 1980). Por tanto el introducir un intercalante en estas células, supondría la muerte de la célula parasitada y consecuentemente la destrucción del parásito que aún no ha completado su ciclo biológico y no ha podido escapar e invadir nuevas células.

Los resultados obtenidos no mostraron efectos considerables, aunque sí significativos tanto para el caso de la infección con *L. donovani* como con *T. cruzi*, y el posterior tratamiento. El complejo metálico con el que mejores resultados se obtuvieron fue el Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato, que provocó una disminución muy significativa en los porcentajes de parasitación (y en menor medida en los índices de infección) en células infectadas por *T. cruzi* y *L. donovani*. El ligando libre se mostró menos efectivo.

Con respecto a las acridinas de nueva síntesis la BG-203, ejerce las mayores reducciones en los porcentajes de parasitación, a las 72 horas para *T. cruzi*, y a las 48 horas para *L. donovani*.

Otras experiencias llevadas a cabo fueron las consistentes en analizar la acción que sobre la parasitación de las células ya indicadas, ejercían formas pretatadas (metacíclicas de *T. cruzi* y promastigotas de *L. donovani*). La existencia en el ciclo biológico de *T. cruzi* de un estadio como

formas tripomastigotas encargadas de acceder al interior de las células, implica que los nuevos productos ensayados en estudios quimioterapéuticos frente a este protozoo tengan que ser probados no sólo frente a las formas de multiplicación, amastigotas, sino también frente a las formas tripomastigotas metacíclicas incapaces de dividirse, si no entran en el interior del citoplasma de una célula hospedadora y se transforman en amastigotas (Brenner, 1973).

En todos los casos ensayados con el pretratamiento de las formas infectivas, se obtuvieron reducciones significativas en los índices de multiplicación tras algunos días de cultivo; mayores incluso a las obtenidas cuando se trataban las células parasitadas.

El pretratamiento de las formas infectantes de *T. cruzi* indujo una reducción de los porcentajes de parasitación con respecto al control, aunque los índices de infección se redujeron en menor medida. Si bien fue efectivo para *L. donovani*, las reducciones logradas fueron menores que para *T. cruzi*. La inhibición en los porcentajes de parasitación logrados, pueden ser reflejo de las alteraciones metabólicas de las formas infectantes tras el tratamiento. Los datos bioquímicos de los parásitos tratados con los compuestos mostraron una disminución en los niveles de los catabolitos excretados, salvo en el caso de *T. cruzi* que aumenta los niveles de acetato, lo cual confirma una posible inhibición del ciclo de Krebs, muy activo en las formas metacíclicas (Adroher y col., 1992).

La inhibición que el tratamiento de los parásitos con los compuestos seleccionados, ejercen sobre enzimas tales como las Piruvato Kinasa (PK), Succinato Deshidrogenasa (SDH) y Malato Deshidrogenasa (MDH), y la consiguiente alteración en la concentración de catabolitos que se produce, podría indicar una disminución en la capacidad energética de los parásitos, y por tanto una falta de actividad. Es conocido que los parásitos si bien entran induciendo una fagocitosis en las células, incluso en las "no fagocíticas" (Dvorak, 1977, Nogueira y Cohn, 1976), necesitan de su maquinaria biosintética intacta para completar la penetración (Dvorak, 1977; Alexander, 1975; Piras, 1983; Osuna y col., 1984, 1993). Esta penetración se vería afectada al alterarse las actividades de los diferentes enzimas que de una u otra forma, se saben que están involucrados en la entrada de estos parásitos en la célula hospedadora. A este respecto, se conoce que una serie de enzimas fundamentalmente proteinkinásas se ven inhibidas por las acridinas (Zollner, 1993), no siendo descartable que algunos de los factores excretados por *T. cruzi* capaces de inducir la entrada en la célula (Ortega Barria y Pereira, 1991) pudieran estar involucrados en los procesos de "turnover" y fosforilación de componentes de superficie de las formas metacíclicas o en la inducción de las vacuolas endocíticas de las células por las que el parásito penetra. Otras enzimas como las transialidasas (Piras, 1985; Osuna y col., 1984) y proteasas (Cazzulo, 1985), se han descrito como involucradas también en los procesos de entrada de *T. cruzi* en su célula hospedadora. El hecho de que los niveles de entrada de *Leishmania* sean menores que los obtenidos para *T. cruzi*, podría deberse al mecanismo "más pasivo" de este parásito para acceder al citoplasma de su célula hospedadora. Normalmente los metapromastigotes de *Leishmania*, tras "estimular" con el flagelo la membrana de las células fagocíticas, son englobadas por estas últimas mediante una fagocitosis normal.

Los bajos niveles de reducción del índice de infección obtenidos con los parásitos tratados previamente a la infección, podrían explicarse por la ineffectividad de la acción sobre algunos de los parásitos a los tiempos de tratamiento, o por la reversibilidad de la acción. Los parásitos que logran acceder al citoplasma celular, completan con mayor o menor grado su multiplicación.

El Ethylxantato de  $K^+$ , ligando libre del complejo metálico seleccionado, mostró resultados comparables a los obtenidos por el complejo tanto en los porcentajes de parasitación, como en el índice de parásitos por célula, cuando las formas infectantes o las células fueron pretratadas por el compuesto. El posible mecanismo de acción de este ligando puede estar relacionado con el mostrado por otras bases xánticas. Sustancias como el Isobutil 1 Metil xantina (Wollheim y Sharp, 1981), que

tiene la particularidad de movilizar el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial y cargar el citosol de  $\text{Ca}^{2+}$  sin aumentar la captación de calcio extracelular (Kikuchi y col., 1978) o la Theofilina (Brisso y Malaise, 1973), que también es capaz de movilizar el  $\text{Ca}^{++}$  intracelular e intramitocondrial, aumentando la concentración citoplasmática del catión. Por otra parte bases xánticas como las mencionadas anteriormente, son capaces de aumentar los niveles citoplasmáticos de AMPc, por bloqueo de la fosfodiesterasa (Wollheim y Sharp, 1981).

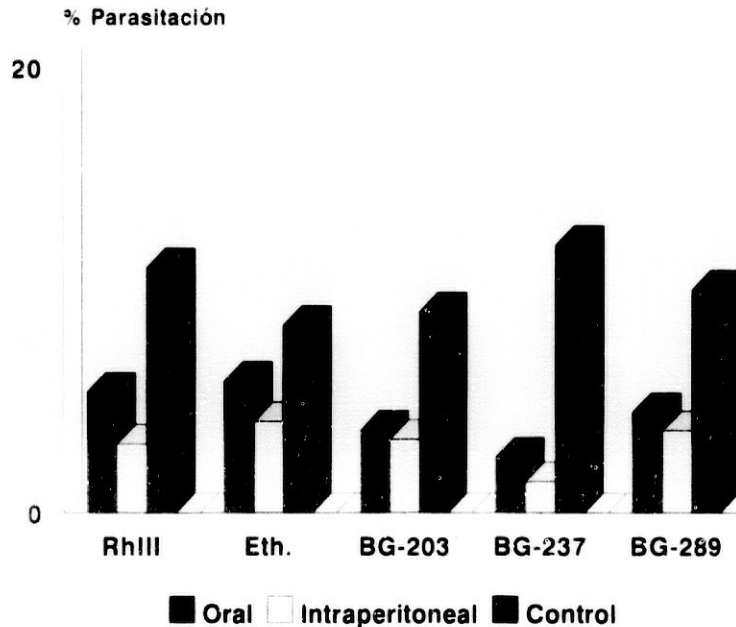
En el proceso de internalización, *Trypanosoma cruzi* necesita de la cooperación de la célula para acceder al interior del citoplasma (Osuna y col., 1993). Dicha cooperación viene reflejada por el hecho de que células previamente parasitadas sean refractarias a la nueva invasión por parásitos (Osuna y col., 1993), o que células tratadas con sustancias capaces de alterar el citoesqueleto, los niveles iónicos intracelulares, o capaces de cargar la célula de AMPc, inducen una reducción notable en la parasitación (Osuna y col., 1990; Osuna y col., 1993). Por este fenómeno podría explicarse el hecho de que el complejo RhIII-Ethylxantato y su ligando libre, sean capaces en las células pretratadas de reducir drásticamente los niveles de parasitemia.

Los protozoos tratados con las moléculas de acridina de nueva síntesis, mostraron una serie de alteraciones comunes. La membrana nuclear aparece separada de la cromatina, fenómeno ya observado con otros agentes intercalantes [como la benzo (de) isiquinolil-1,3-diona (Castanys y col., 1984)] y que supone la muerte de los protozoos por apoptosis. Sin embargo otros fenómenos observados con estas moléculas (especialmente la BG-237), muestran por primera vez membranas mitocondriales hexa o heptalaminares; aparición de vacuolas lipídicas posiblemente debidas a alteraciones mitocondriales (pérdida de crestas) y del metabolismo glucídico, que corroboran los datos bioquímicos obtenidos tras el tratamiento de los parásitos. Las "figuras mielínicas en huella digital", la aparición de membranas electrodensas y la formación de vacuolas intravacuolares, obtenidas en el caso del tratamiento con los compuestos BG-289, BG-237 y BG-203, indican unión de los compuestos a las membranas del retículo endoplasmático y aparato de Golgi; quizás alterando la permeabilidad de los orgánulos y de las cisternas, dando lugar a la aparición de dictiosomas engrosados. El tratamiento de las células con los diferentes compuestos dio una serie de modificaciones ultraestructurales, semejantes a las observadas en las formas flageladas de los parásitos: figuras mielínicas, retículo endoplasmático engrosado y alteraciones mitocondriales con reducción de las crestas y aparición de matriz electrodensa. Los núcleos muestran condensaciones anormales de cromatina, aunque no aparecen fenómenos de apoptosis claros como ocurre en los parásitos, ni fenómenos en la membrana mitocondrial como se observa en los parásitos tratados con el derivado BG-237. Sin embargo los fenómenos autofágicos y de desorganización citosólica indican que la muerte celular se debe a fenómenos de apoptosis, quizás como consecuencia del bloqueo en la síntesis proteica y consecuente degeneración de los sistemas enzimáticos citosólicos.

Una vez estudiado el efecto que ejercen los diferentes compuestos ensayados, frente a las formas flageladas o aflageladas de los parásitos, y comprobada la inhibición en la capacidad de infección de nuevas células por los parásitos pretratados; se procedió a realizar una serie de ensayos "in vivo", donde los animales previamente infectados fueron tratados a las dosis indicadas en Material y Métodos. Estas dosis se obtuvieron de una extrapolación de los datos de citotoxicidad obtenidos sobre los cultivos celulares. La vía de administración fue oral y sistémica intraperitoneal en el caso de los animales previamente infectados por *L. donovani*; mientras que en el caso de los animales infectados por *T. cruzi* la vía utilizada fue intraperitoneal. El excipiente utilizado fue aceite de oliva. Transcurrido el tiempo de tratamiento, los animales fueron sacrificados y en el caso de *L. donovani* se estudiaron parámetros tales como el tamaño y longitud del bazo, número de parásitos intracelulares y porcentaje de células esplénicas afectadas. Los datos obtenidos (que en el caso de *L. donovani* se resumen en el diagrama de barras adjunto), reflejan que todos los compuestos ensayados fueron

efectivos, reduciendo de una manera notable los porcentajes de parasitación esplénica en el caso de *L. donovani*.

### Disminución de la parasitación ejercida por los compuestos



En el caso de *T. cruzi*, los ensayos "in vivo" fueron encaminados a la posible utilización de los compuestos de nueva síntesis, como sustancias profilácticas aplicables en Bancos de Sangre. En datos obtenidos por la O.M.S. en 1980, se estimó que las mayores tasas de infección en áreas urbanas por *T. cruzi*, se debe a la transfusión sanguínea; estimándose sólo en Brasil unos 20.000 casos nuevos de esta enfermedad como consecuencia de esta vía de infección. Por éste motivo, y como se describió en Material y Métodos, se realizaron estas experiencias utilizando como control una solución de violeta de genciana (Docampo y col., 1991); compuesto que actualmente se considera como el único efectivo para este tipo de profilaxis. Sin embargo, esta sustancia conlleva una serie de efectos secundarios como son alteraciones de las células sanguíneas, alteraciones de las propiedades físico-químicas de la sangre; y una propiedad a tener muy en cuenta que es su posible efecto cancerígeno (Docampo y col., 1991). De los resultados obtenidos, se desprende, que si bien el violeta de genciana se ha mostrado más efectivo que los compuestos ensayados, provocaba alteraciones en la sangre del tipo de microaglutinaciones y alteraciones eritrocitarias. Estas alteraciones impiden la incubación de la sangre con éste compuesto durante más de siete días. Con los compuestos seleccionados por nosotros, no encontramos estas alteraciones. Estudiadas las parasitemias de los animales y viendo la supervivencia de los ratones, se deduce que el complejo Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato tiene prácticamente los mismos efectos sobre los animales infectados que el ligando libre. En cuanto a los derivados acridínicos, se sometieron a un estudio de simulación al ordenador en función de los datos obtenidos "in vivo", para determinar los tiempos de curación teórica y la progresión en la viabilidad que provocarían en los animales tratados. Estos datos coincidieron con los obtenidos de las experiencias. Los tres compuestos se mostraron efectivos, siendo el teóricamente más activo el BG-237 seguido muy de cerca del BG-289 y con un 7 % menos de efectividad el BG-203. No obstante, y bajo nuestras condiciones experimentales, en ningún caso se indujo una eliminación completa de los parásitos en sangre.

Al objeto de conocer el modo de acción de los compuestos seleccionados sobre el metabolismo intermediario de *T. cruzi* y *L. donovani*, estudiamos mediante resonancia magnética nuclear de protones, la producción de succinato, acetato, piruvato, etanol y lactato de las formas tratadas y no tratadas con los compuestos seleccionados. Conocidos los espectros de los medios de cultivo, procedimos a cuantificarlos enzimáticamente.

Se conoce que *T. cruzi*, y *L. donovani*, en sus formas flageladas y amastigotas intracelulares son capaces de respirar y mantener su producción de energía en ausencia de fuentes carbonadas exógenas (Ryley y col, 1956). Esto contrasta con lo que ocurre con las formas tripomastigotas sanguíneas de *T. brucei* con un metabolismo menos oxidativo. Este comportamiento en *T. cruzi* y *L. donovani* implica la existencia de importantes reservas energéticas, fundamentalmente ácidos grasos, dada la ausencia de glucógeno (Rogerson y Gutteridge, 1986) y las pequeñas cantidades de otros azúcares como glucosa y trehalosa (Fairbairn, 1958). En este sentido algunos autores (Ryley, 1956; Roitman y Gutteridge, 1978) coinciden en la ausencia de reservas de glucógeno y la utilización de triglicéridos como reserva energética; constituyendo la fuente energética exógena prioritaria en las formas epimastigotas, metacíclicas y amastigotas (Rogerson y Gutteridge, 1980; Wood, 1975).

Tanto *T. cruzi* como *L. donovani* son capaces de degradar la glucosa bajo rutas aeróbicas y anaeróbicas. La degradación aeróbica no conduce exclusivamente a la degradación total y formación de CO<sub>2</sub> sino que realmente constituye una mezcla de fermentación y oxidación aeróbica con liberación de cantidades de succinato (34%), acetato (20%), malato (3.8%) y piruvato (1%) para los epimastigotes de *T. cruzi* y succinato (12%), acetato (17%), lactato (6%) y piruvato (1%) para los tripomastigotes sanguíneos (Bowman y col., 1963).

Bowman, Tome y Brand (1963) encuentran que en anaerobiosis se produce un aumento de la excreción de succinato (72%), una reducción en la excreción de acetato (8.3%) y la excreción de citrato (1%).

En el caso de *Leishmania*, el catabolismo de la glucosa en condiciones aerobias y empleando como única fuente carbonada la glucosa, se excreta succinato, acetato, piruvato, alanina, lactato y pequeñas cantidades de glicerol (Toner y Weber, 1972). Mientras que en condiciones anaeróbicas o bajo atmósfera de CO<sub>2</sub>, la excreción de glicerol aumenta. El lactato procede, en las formas promastigotes intactas, de la vía del ciclo del glioxalato desde la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (Krisans y col., 1980). Se ha demostrado así mismo que otras enzimas como la metilglioxal sintasa, las glioxilasas I y II y las NADPH dependientes del metilglyoxal están presentes en las formas promastigotes de *L. donovani* (Gottlieb y Dwyer, 1983).

En hipoxia, la producción de glicerol y D-lactato está bien caracterizada (Hammond y col., 1981; Hart y Oppendoes, 1983; Krisans y col., 1980). Quizás la producción de estos catabolitos sea consecuencia de alteraciones en el flujo a través de la ruta glucolítica, más que debida a alteraciones enzimáticas sobre el ciclo del glioxalato. De igual manera, bajo condiciones anaeróbicas se incrementa la excreción de succinato (Hammond, 1981), piruvato y glicerol mientras que la producción de acetato disminuye (Hart, 1980). En la producción de succinato probablemente bajo condiciones anaeróbicas intervengan el glicosoma y la mitocondria conjuntamente. El fosfoenolpiruvato glicosomal junto con el enzima FosfoenolPiruvatoCarboxikinasa (PEPCK), producen oxalacetato que al ser reducido por la Malato Deshidrogenasa (MDH) presente en el glicosoma, dará malato. Este último, en la mitocondria debe ser convertido a fumarato y succinato vía Fumarato Reductasa, con lo que el enzima málico debe estar presente en los dos orgánulos (mitocondria y glicosoma). Estos datos aplicables a *Leishmania* han sido demostrados en *T. cruzi* (Cataldi de Flourhaum y col., 1977; Cazzulo y col., 1980). Estas actividades del enzima málico, se han demostrado en las tres formas del parásito; mostrando los

## DISCUSION

amastigotes menos actividad enzimática que los epimastigotes y sanguíneos (Rogerson y Gutteridge, 1980).

El acetato es el compuesto mayoritario excretado por los promastigotes de *Leishmania* bajo condiciones aerobias. Bajo hipoxia el succinato es el mayoritario con el acetato; excretándose también piruvato, alanina y D-lactato. La ruta que se sigue para la excreción de acetato en *Leishmania*, se desconoce por el momento aunque lógicamente debería estar involucrada en ella la citrato liasa, que a partir del citrato produciría acetato. Otra posible vía sería con participación de la Piruvato Deshidrogenasa o la Lactato Oxidasa, que desde piruvato o lactato originan acetato.

El enzima Piruvato Deshidrogenasa se ha caracterizado en formas epimastigotas de *T. cruzi* (Miller y col., 1976); y las actividades de los enzimas del ciclo de Krebs, se han caracterizado en todas las formas de *T. cruzi* y *L. donovani*, si bien algunas formas como las tripomastigotas metacíclicas poseen una actividad diez veces mayor que la actividad mostrada por los epimastigotes. Por otra parte las formas trypomastigotas sanguíneas muestran en todos los casos una actividad del ciclo de los ácidos tricarbónicos al menos dos veces menor que la que muestran las formas flageladas no infectivas (Miller y col., 1976).

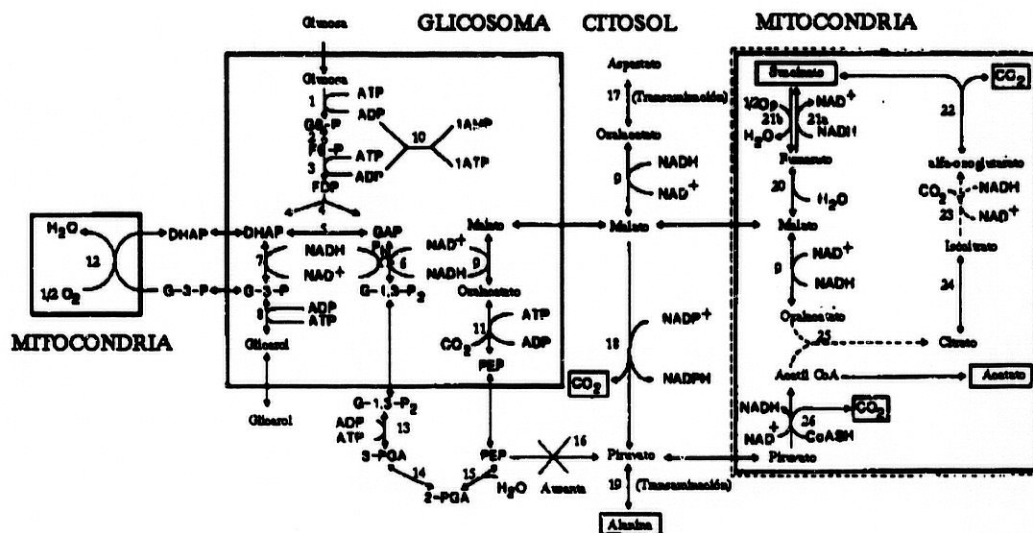
Cuando se adicionan los compuestos RhIII Ethylxantato, BG-203, BG-237 y BG-289 y el ligando Ethylxantato de K<sup>+</sup> sobre los cultivos, y se determinan los metabolitos por RMN[<sup>1</sup>H], en el espectro resultante de las moléculas excretadas, aparece un pico correspondiente al DMSO que se utiliza para la disolución del producto. En experiencias control, encontramos que la presencia de este disolvente podía provocar ligeros desplazamientos en la escala de determinados metabolitos (en relación con sus posiciones habituales reportadas por la bibliografía). Este hecho fue tenido en cuenta a la hora de identificar los diferentes picos.

Es de destacar que en líneas generales, en las formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas con los derivados acridínicos los niveles de glicina y piruvato descienden respecto a la excreción de los epimastigotes controles, mientras que la excreción de acetato se incrementa aunque debilmente con las compuestos BG-203 y BG-289. Un comportamiento diferente tuvieron los promastigotes de *L. donovani* tratados con las mismas moléculas. La excreción del succinato se incrementó en todos los casos, y únicamente el compuesto BG-237 mostró un descenso en la excreción de todos los catabolitos con la excepción del Succinato.

El complejo metálico condujo a una reducción drástica de la excreción de piruvato, succinato, acetato o alanina, en las formas promastigotas de *L. donovani*. Igual ocurrió cuando estas formas se trataron con el ligando libre. Es destacable el caso del piruvato, donde tanto la forma ligada al metal como el ligando inhibió completamente la excreción de este ácido. Sin embargo con los epimastigotes de *T. cruzi*, la excreción de piruvato se incrementó ligeramente con respecto al control. Este fenómeno pudiera ser un ejemplo más del diferente comportamiento bioquímico de las formas flageladas de estos dos protozoos tan emparentados biológicamente.

La inhibición que ejercieron los compuestos estudiados en la excreción de catabolitos en los flagelados parásitos (indicada en las tablas resumen nº 1 y nº 2), se corroboró con las inhibiciones enzimáticas inducidas por los compuestos sobre extractos de *T. cruzi* y *L. donovani*. Estos datos, dada la localización de las enzimas estudiadas y la procedencia de los catabolitos (esquema nº 1), confirman los datos obtenidos por microscopía electrónica, donde uno de los posibles blancos de acción de las acridinas son las mitocondrias de las formas flageladas, con inhibición probable en el intercambio de sustratos y metabolitos entre Glicosoma→Citosol→Mitocondria y Mitocondria→Citosol→Glicosoma.





ESQUEMA nº1.- Rutas del metabolismo de la glucosa en formas tripomastigotas de *T. cruzi*. La localización de los enzimas en el glicosoma y citosol ha sido confirmada, si bien no se ha demostrado aún con claridad la localización de los enzimas mitocondriales (con excepción de la glicerolfosfato oxidasa y la malato deshidrogenasa). Los productos finales del metabolismo aerobio y anaerobio se representan encerrados en cuadros. Las líneas discontinúas indican que la acción catalítica de esos enzimas, aún no se ha confirmado plenamente. 1, hexokinasa; 2, fosfoglicosa isomerasa; 3, fosfofructokinasa; 4, aldolasa; 5, triosa fosfato isomerasa; 6, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; 7, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; 8, glicerol kinasa; 9, malato deshidrogenasa; 10, adenilato kinasa; 11, fosfoenolpiruvato carboxikinasa; 12, glicerol-3-fosfato oxidasa; 13, fosfoglicerato kinasa; 14, fosfoglicerato mutasa; 15, enolasa; 16, piruvato kinasa; 17, aspartato aminotransferasa; 18, enzima málico; 19, alanina aminotransferasa; 20, fumarato hidratasa; 21a, fumarato reductasa; 21b, succinato deshidrogenasa; 22, α-oxoglutarato descarboxilasa; 23, isocitrato deshidrogenasa; 24, aconitasa; 25, citrato sintasa; 26, piruvato deshidrogenasa. (Adaptado de Fairlamb y Opperdoes, 1986).

|                             | Glicina | Piruvato | Succinato | Acetato | Alanina | Lactato | Etanol |
|-----------------------------|---------|----------|-----------|---------|---------|---------|--------|
| <i>T. cruzi</i> no tratados | 1.00    | 4.35     | 0.10      | 3.00    | 0.95    | 2.90    | 0.30   |
| <i>T. cruzi</i> +RhIII Eth. | 0.40 ↓  | 5.10 ↑   | 0.10      | 3.60 ↑  | 0.70 ↓  | 2.30 ↓  | 0.40 ↑ |
| <i>T. cruzi</i> +Ligando    | 0.30 ↓  | 4.50 ↑   | 0.60 ↑    | 2.90 ↓  | 0.50 ↓  | 1.90 ↓  | 0.20 ↓ |
| <i>T. cruzi</i> +BG-203     | 0.70 ↓  | 2.20 ↓   | 0.10      | 3.75 ↑  | 0.95    | 2.70 ↓  | 0.30   |
| <i>T. cruzi</i> +BG-237     | 0.70 ↓  | 1.50 ↓   | 0.10      | 2.80 ↓  | 0.65 ↓  | 2.25 ↓  | 0.30   |
| <i>T. cruzi</i> +BG-289     | 0.70 ↓  | 2.10 ↓   | 0.10      | 4.60 ↑  | 1.00 ↑  | 3.00 ↑  | 0.40 ↑ |

Tabla resumen n°1: efecto que ejerce el tratamiento con los diferentes productos seleccionados sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Los resultados vienen expresados en valor absoluto de longitud, determinado sobre los espectros de RMN[<sup>1</sup>H]. (↑ incremento respecto al control no tratado; ↓ disminución respecto al control no tratado).

|                                | Piruvato | Succinato | Acetato | Alanina | Lactato | Etanol |
|--------------------------------|----------|-----------|---------|---------|---------|--------|
| <i>L. donovani</i> no tratadas | 6.80     | 1.00      | 6.15    | 1.55    | 1.25    | 0.30   |
| <i>L. donovani</i> +RhIII Eth. | 0.00 ↓   | 0.40 ↓    | 0.65 ↓  | 0.70 ↓  | 1.30 ↑  | 0.20 ↓ |
| <i>L. donovani</i> +Ligando    | 0.00 ↓   | 0.40 ↓    | 0.65 ↓  | 0.70 ↓  | 1.40 ↑  | 0.20 ↓ |
| <i>L. donovani</i> +BG-203     | 6.80     | 2.65 ↑    | 6.00 ↓  | 1.40 ↓  | 1.00 ↓  | 0.30   |
| <i>L. donovani</i> +BG-237     | 5.10 ↓   | 1.40 ↑    | 3.70 ↓  | 0.80 ↓  | 0.65 ↓  | 0.10 ↓ |
| <i>L. donovani</i> +BG-289     | 6.80     | 3.10 ↑    | 6.15    | 1.50 ↓  | 1.20 ↓  | 0.20 ↓ |

Tabla resumen n°2: efecto que ejerce el tratamiento con los diferentes productos seleccionados sobre formas promastigotas de *Leishmania donovani*. Los resultados vienen expresados en valor absoluto de longitud, determinado sobre los espectros de RMN[<sup>1</sup>H]. (↑ incremento respecto al control no tratado; ↓ disminución respecto al control no tratado).

---

*DISCUSION*

Teniendo en cuenta los resultados de todos estos estudios, creemos que sería de gran interés realizar estudios farmacológicos y galénicos a fin de determinar la biodisponibilidad, modo de excreción, acumulación, pautas de administración, etc. de los compuestos estudiados.

El objeto de estas investigaciones sería encontrar un nuevo fármaco para ser utilizado con fines terapéuticos, que supusiera abrir un nuevo camino en el tratamiento de la leishmaniosis visceral y de la enfermedad de Chagas.

CONCLUSIONES.

## CONCLUSIONES

---

1.- Las formas flageladas infectantes de *Leishmania donovani* y de *Trypanosoma cruzi* pueden transformarse en formas amastigotas, elevando bruscamente la temperatura de cultivo de 28 a 37 °C y empleando medio TC-199, adicionado con un 30% de suero bovino fetal inactivado a 36° C durante 30 minutos.

Los amastigotes de *L. donovani* obtenidos de esta forma, demuestran gran capacidad de multiplicación en células fagocíticas.

2.- Tanto los amastigotes de *T. cruzi* como los de *L. donovani* obtenidos "in vitro", muestran características morfológicas, antigénicas y bioquímicas similares a las de las formas intracelulares de sus ciclos biológicos naturales, siendo metabólicamente diferentes a las formas flageladas de las que proceden.

3.- De los complejos metálicos evaluados frente a las formas epimastigotas de *T. cruzi* y promastigotas de *L. donovani*, los que muestran más actividad frente a ambos protozoos son aquellos que incluyen en su estructura al Rh<sup>III</sup> como metal, asociado a un derivado del xantato y al Cl<sup>-</sup>.

4.- El pretratamiento de las formas infectivas de *T. cruzi* y *L. donovani*, ó el de las células que van a actuar como hospedadoras, con el Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato, conduce a una reducción en los niveles de parasitación obtenidos.

5.- En las formas promastigotas de *L. donovani* tratadas con Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato, se demuestra una inhibición total de la excreción de piruvato, y en menor medida de la de acetato y alanina, al tiempo que el estudio ultraestructural refleja alteraciones a nivel mitocondrial.

6.- En las formas epimastigotas de *T. cruzi* tratadas con Rh<sup>III</sup>-Ethylxantato se constata una disminución de la excreción de alanina, glicina y lactato, y un incremento en la excreción de piruvato, acetato y etanol. Ello unido a lo demostrado en *L. donovani* confirma las diferencias a nivel bioquímico y de respuesta a fármacos entre ambos protozoos.

7.- El tratamiento con derivados acridínicos de las formas epimastigotas de *T. cruzi* y promastigotas de *L. donovani*, actúa disminuyendo las tasas de multiplicación, afectándose la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas.

Entre los derivados acridínicos ensayados, los más activos como antiprotozoarios frente a *T. cruzi* y *L. donovani* son: el (3NH<sub>2</sub>-9-S-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)Acridina; el [2-metoxi-6-Cl-9-S-(2-N-dietilaminoetil)io]Acridina; y el [3Cl-9S-(2-N-dietilaminoetil)io]Acridina.

8.- El pretratamiento de los parásitos, ó de las células que van a actuar como hospedadoras, con los derivados acridínicos más activos conduce a una reducción en los niveles de parasitación obtenidos.

9.- El estudio ultraestructural de las formas epimastigotas de *T. cruzi* y promastigotas de *L. donovani* tratadas con los derivados acridínicos más activos, muestra alteraciones a nivel nuclear, mitocondrial y en los complejos membranales citosólicos.

10.- El tratamiento de las formas promastigotas de *L. donovani* y las epimastigotas de *T. cruzi* con los derivados acridínicos más activos, conduce a una inhibición en la actividad enzimática de la succinato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa y piruvato kinasa. Mientras que en *L. donovani* se demuestra una inhibición en la excreción de alanina, lactato y etanol; en *T. cruzi* ésta es relativa a la glicina y piruvato, siendo variable la excreción del resto de metabolitos y dependiente del derivado acridínico en estudio.

11.- El estudio de la acción "in vivo" del complejo RhIII-Ethylxantato, su ligando libre, y los derivados acridínicos (3NH<sub>2</sub>-9-S-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)Acridina, [2-metoxi-6-Cl-9-S-(2-N-dietilaminoetilio)]Acridina y [3Cl-9S-(2-N-dietilaminoetilio)]Acridina, demuestra una reducción en las tasas de parasitación esplénica obtenidas en cricetos experimentalmente infectados; lo que indica su posible acción potencial como agentes leishmanicidas.

12.- Las pruebas realizadas con los derivados acridínicos más activos, en vías a un posible empleo quimioprolifático en bancos de sangre, si bien reflejan una acción inhibitoria de la capacidad infectante de los tripanosomas sanguíneos, no conduce a su eliminación, lo que descarta por el momento su utilidad en este sentido.

#### CONCLUSION GENERAL

Esta Memoria de Tesis Doctoral aporta nuevos datos al conocimiento de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania donovani*, dos protozoos de enorme interés sanitario. En el convencimiento de que sólo la profundización en el estudio de la biología de estos agentes puede conducir al diseño racional de fármacos, se ha estudiado a distintos niveles la acción antiprotozoaria de compuestos de nueva síntesis tanto de Rh<sup>III</sup> como de tres derivados de la acridina. Los resultados obtenidos son una base para estudios posteriores de relación estructura-actividad, en vías al desarrollo de terapias alternativas a las que actualmente existen.

**6.- BIBLIOGRAFIA.**

**6.- BIBLIOGRAFIA.**



BIBLIOGRAFIA

---

- ABITOL, H.; PIULATS, E.; PODESTA, D.; BORIS, E.; SCHEER, A.; 1972. Ensayo farmacológico experimental de la Anfotericina B sobre *T. cruzi*. Bol. Chi. Parasitol., 27, pp. 99-100.
- ADACHI, A. 1968. Effect of Acriflavine and 4-Nitroquinoline-N-Oxide Saccharomyces Cerevisiae. Biol. J. Nara Women`s Univ. 18, p. 12.
- ADLER, S.; BER, M. 1941. The transmission of *Leishmania tropica* by the bite of *Phlebotomus papatasi*. Ind. J. Med. Res., 29, pp. 803-9.
- ADROHER, F. J.; OSUNA, A.; LUPIAÑEZ, J. A. 1990. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. II. Hexokinase, phosphofructokinase, and pyruvate kinase. Mol. Cell. Biochem. 94, pp. 71-82.
- ADROHER, F. J.; LUPIAÑEZ, J. A.; OSUNA, A. 1988. Influence of saccharides and sodium chloride on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Cell Differ. 22, pp. 165-170.
- ADROHER, F. J. 1989. Oxidación de la glucosa en *T. cruzi*. Ars Pharm. Tomo 30, nums. 3-4, pp. 245-256.
- ADROHER, F. J.; OSUNA, A.; LUPIAÑEZ, J. A. 1988. Struvite crystal formation by *Trypanosoma cruzi* in culture. Arch. Biochem. Biophys.; 267, pp. 252-261.
- ADROHER, F. J. 1985. Tesis Doctoral. Estudios Fisiológicos y Bioquímicos de *T. cruzi*. Universidad de Granada. Granada. España.
- ADROHER, F. J.; OSUNA, A.; LUPIAÑEZ, J. A. 1992. Phloretin and citrate promote the differentiation rate from epimastigote to metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. Act. Trop. 50, pp. 79-85.
- AGOSIN, M.; NAQUIRA, C.; PAULIN, J.; y CAPDEVILLA, J.; 1976. Cytochrome P-450 and drug metabolism in *Trypanosoma cruzi*: effect of Phenobarbital. Science, 194 pp. 195-197.
- AL-CHABALI, K.; GUTTERIDGE, W. E. 1977. Presence and properties of Thymidilate synthase in trypanosomatids. Biochem. Biophys. Acta. 481; pp. 71-79.
- ALBERT, A. 1966. The acridines; 2nd. ed. (Arnold, London).
- ALDERSON, T.; KHAN, A. H. 1968. Acridine Mutagenesis (in the Dark) in *Drosophila Melanogaster*. Mutation Res. 5, p. 147.
- ALEXANDER, J., AND VICKERMAN, K. 1975. Fusion of host cell secondary lysosomes with parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. J. Protoz. 22, pp. 502-508.
- ALEXANDER, J. 1978. Unusual axonemal doublet arrangement in the flagellum of *Leishmania* amastigotes. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 72. pp. 345-7.

- ALEXANDER, K., PARSONS, M. 1991. *Molecular Biochem. Parasitol.* 46 (1) pp. 1-10. Citado por CASTILLA-CALVENTE, J. J.; SANCHEZ-MORENO, M.; MESA-VALLE, C.; OSUNA, A. 1994. The "in vitro" culture of *L. donovani* and [<sup>3</sup>H]NMR characterization of its amastigote-like forms. *Mol. Cell. Biochem.* Aceptado para publicación, Febrero de 1994.
- ALVAR, J.; VERDEJO, J.; OSUNA, A. y NAJERA, R.; 1987. Visceral leishmaniasis in a patient seropositive for HIV. *Europ. J. Clin. Microbiol.*, 6 (5) pp. 604-606.
- ALVING, C. R.; STECK, E. A.; CHAPMAN, W. L. Jr.; WAITS, V. B.; HENDRICKS, L. D.; SWARTZ, G. M.; HANSON, W. L. 1980. Liposomes in leishmaniasis: therapeutic effects of antimonial drugs, 8-aminoquinoleines and tetracyclines. *Life Sciences*, 26, pp. 2231-8.
- ALVING, C. R.; STECK, E. A.; HANSON, W. L.; LOIZEAUX, P. S.; CHAPMAN, W. L. Jr.; WAITS, V. B. 1978,a. Improved therapy of experimental leishmaniasis by use of a liposome-encapsulated drugs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75, pp. 2959-63.
- ALVING, C. R.; STECK, E. A.; CHAPMAN, W. L. Jr.; WAITS, V. B.; HENDRICKS, L. D.; SWARTZ, G. M. Jr.; HANSON, W. L. 1978,b. Therapy of leishmaniasis: superior efficacy of liposome encapsulated drugs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75, pp. 2959-63.
- ALLISON, A. C.; PATON, G. R. 1965. Chromosome Damage in Human Diploid Cells Following Activation of Lysosomal Enzymes. *Nature*, 207, p. 1170.
- AMAN, R. A. , KENYON, G. L. , WANG, C. C. 1985. *J Biol. Chem.* 260: 6966-6973. Citado por LAMBEIR, A. M.; OPPERDOES, F. R.; WIERENGA, R. K. 1987. Kinetic properties of triose-phosphate isomerase from *T. brucei brucei*. *Eur. J. Biochem.* 168, pp. 69-74.
- AMAN, R. A. , WANG, C. C. 1986 . *Mol . Biochem. Parasitol .* 19: 1-10. Citado por LAMBEIR, A. M.; OPPERDOES, F. R.; WIERENGA, R. K. 1987. Kinetic properties of triose-phosphate isomerase from *T. brucei brucei*. *Eur. J. Biochem.* 168, pp. 69-74.
- AMES, B.; WHITFIELD, H. 1966. Frameshift Mutagenesis in Salmonella. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, p. 221.
- AMOS, A. T. 1967. Self-consistent Perturbation Theory for Conjugate Molecules. IV-First Order Changes in Orbital Energie Correlation with Ionization Potentials of Heteromolecules. *Theor. Chim. Acta*, 7, p. 20.
- ANDRADE, S. G.; FIGUEIRA, R. M.; 1977. Estudo experimental sobre a ação terapeutica de Droga Ro 7-1051 Na infecção por diferentes cepas de *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 19 pp. 335-341.
- ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K.; SLATIN, S. L.; GRIFFITHS, G. 1990. *Cell.* 61, pp. 1277-1287. Citado por OSUNA, A.; RODRIGUEZ-CABEZAS, N.; BOY, M.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. 1993. The invasion mechanism of the metacyclic forms of *T. cruzi* in nonphagocytic Host Cell. *Biol. Res.* , Vol. 26, 1, pp. 19-26.
- APT, W.; MANCILLA, R.; DIAZ, M. y DIAZ, S. 1972. Efecto del Lampit (Bayer 2502) sobre la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Bol. Chi. Parasitol.*; 27 pp. 80-87.

BIBLIOGRAFIA

AVILA, J. L.; CONVIT, J.; PINARDI, M. E.; JACQUES, P. J.; 1976. Loss of infectivity of Micobacteriae and Protozoae exoplasmic parasites after exposure "in vitro" to the polienzimic cocktail "PIGO". Bio. Soc. Trans. 4 pp. 680-681.

AVILA, J. L.; PEREZ-KEPP, R.; BRETANA A. 1983. A minimal medium for the cultivation of infective *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. J. gen. Microbiol. 129, 285-291.

AVILA, J. L.; AVILA, A.; ARGELIA DE CASANOVA, M.; 1981.a. Differential metabolism of allopurinol and derivatives in *T. rangeli* and *T. cruzi* culture forms. Mol. Biochem. Parasitol., 4 (5-6) pp. 265-272.

AVILA, J. L.; BRETANA, A.; JACQUES, P. J.; CASANOVA, M. A.; CONVIT, J.; 1978. Killing of several pathogenic protozoa by free-radical generator systems. Current Chemotherapy, 12 pp. 153-155.

AVILA, J. L.; BRETANA, A.; AVILA, A.; 1979. Chemotherapy with Ethidium Bromide-DNA complex in established Chagas` disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 28 (3) pp. 456-460.

AVILA, J. L.; AVILA, A.; MUÑOZ, E.; 1981.b. Effect of allopurinol on different strains of *T. cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30 (4) pp. 769-774.

BACCHI, C. J. y col. 1990. Antimicrob. Agents Chemother. 34, p. 1183. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanotione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: Molecular and Immunological Aspects of Parasitism. 1991. C.C. Wang ed. USA.

BACHRACH, U.; BREM, S.; WERTMAN, S. B.; SCHNUR, L. F.; GREENBLATT, C. L. 1979. b. *Leishmania spp.*: Effect of Inhibitors on Growth and on Polyamine and Macromolecular Syntheses. Experiment. Parasitol., 48, pp. 464-70.

BACHRACH, U.; BREM, S.; WERTMAN, S. B.; SCHNUR, L. F.; GREENBLATT, C. L. 1979.a. *Leishmania spp.*: Cellular levels and synthesis of polyamines during growth cycles experimental parasitology. 48, pp. 457-63.

BALABAN, N., GOLDMAN, R. 1990. Exp. Cell Res. 191(2): pp. 219-229. Citado por CASTILLA-CALVENTE, J. J.; SANCHEZ-MORENO, M.; MESA-VALLE, C.; OSUNA, A. 1994. The "in vitro" culture of *L. donovani* and [<sup>1</sup>H]NMR characterization of its amastigote-like forms. Mol. Cell. Biochem. Aceptado para publicación, Febrero de 1994.

BALANA-FOUCE, R.; ORDOÑEZ, D.; ALUNDA, J. M. 1989. Mol. Biochem. Parasitol. 35, p.43. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanotione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: Molecular and Immunological Aspects of Parasitism. 1991. C.C. Wang ed. USA.

BASS, K.E., WANG, C.C. 1992. Mol. Biochem. Parasitol. 56(1): 129-140. Citado por CASTILLA-CALVENTE, J. J.; SANCHEZ-MORENO, M.; MESA-VALLE, C.; OSUNA, A. 1994. The "in vitro" culture of *L. donovani* and [<sup>1</sup>H]NMR characterization of its amastigote-like forms. Mol. Cell. Biochem. Aceptado para publicación, Febrero de 1994.

BATES, 1993. Axenic Culture of *Leishmania* amastigotes. Parasitol. Today, 9, 4, pp. 143-146.

- BATES, P. A. y col., 1992. Parasitol., 105, pp. 193-202. Citado por BATES, 1993. Axenic Culture of *Leishmania* amastigotes. Parasitol. Today, 9, 4, pp. 143-146.
- BEACH, D. H.; GOAD, L. J.; HOLZ, G. G. J. 1988. Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. Mol. Biochem. Parasitol., 31 (2) pp. 149-62.
- BENHE, R. 1985. TRENDS Genet. 1; pp. 117-121. Citado por MICHELS, P. A. M. 1989. Characterization of Trypanosomal Glycolytic Enzymes. Proceedings of the Workshop on Chemotherapy of Trypanosomes, Nairobi. pp. 1-10.
- BERENS, R. L.; MARR, J. J.; NELSON, D. J.; LAFON, S. W. 1980. Antileishmanial effect of allopurinol and allopurinol ribonucleoside on intracellular forms of *L. donovani*. Biochemical Pharmacology, 29, pp. 2397-8.
- BERENS, R. L.; MARR, J. J. 1979. Growth of *L. donovani* amastigotes in a continuous macrophage-like cell culture. J. Protozool., 26, pp. 453-456. Citado por Escario y Gómez, 1992. En: Avances en Parasitología. Universidad de Santiago de Compostela Eds.
- BERGMEYER, H. R. 1988. Methods of Enzymatic Analysis, (Bergmeyer, H. R., Bergmeyer, J. and GraBl, M.) VCM, Weinheim.
- BERMAN, J. D.; HOLZ, G. G.; BEACH, D. H. 1984. Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *L. mexicana* promastigotes in culture. Mol. Biochem. Parasitol. 12 (1), pp. 215-21.
- BERMAN, J. D.; WADDELL, D., HANSON, B. D. 1985. Biochemical mechanisms of the antileishmanial effects of sodium stibogluconate. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 27 pp. 916-20.
- BERMAN, J. D.; KEENAN, C. M.; LAMB, S. R.; HANSON, W. L.; WAITS, V. B. 1983. *L. donovani*: oral efficacy and toxicity of formycin B in the infected hamster. Experiment. Parasitol., 56 (2) pp. 215-21.
- BERMAN, J. D.; AIKAWA, M. 1984. Activity of immunoglobulin G-coated red cells ghosts containing pentamidine against macrophage-contained *Leishmania* "in vitro". Amer. J. Trop. Med. Hyg., 33 (6) pp. 1112-8.
- BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V.; WILLIAMS, J. S.; HOCMEYER, W. D. 1986. Activity of pentamidine containing human red cell ghosts against visceral leishmaniasis in the hamsters. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 35 (2) pp. 297-302.
- BERMAN, J. D.; LEE, L. S. 1983. Activity of oral drugs against *L. tropica* in human macrophages "in vitro". Amer. J. Trop. Med. Hyg., 32 (5) pp. 947-51.
- BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. F.; GALLALEE, J. V. 1988. Pharmacokinetics of pentavalent antimony (Pentostam) in hamsters. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 39 (1), pp. 41-47.
- BERNARD, J.; RIOU, G.; 1976. Biochemical action of ellipticine derivatives on *T. cruzi*. En: Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships. (H. Van den Bossche, ed.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 477-484.

## BIBLIOGRAFIA

---

- BERNARD, J.; DA-SILVA, J.; RIOU, G.; 1979. Mode de action of an intercalating drug N-6-methylellipticine iodomethylate on *T. cruzi*. *J. Protozool.*, 26 (3,1) pp. 52A-53A.
- BERNARD, J.; RIOU, G.; 1977. Effects of 9 hidroxyellipticine on "in vitro" transcripcion of *T. cruzi* DNAs. *Biochem. Biophys. Research Communic.*, 77 (4) pp. 1189-1194.
- BERNARD, J.; DAT-XUONG, N.; RIOU, G.; 1975. Activité trypanocide de quelques dérivés de l'ellipticine sur *T. cruzi* cultive "in vitro". *Comp. Rend. Acad. Sciences, Paris*, 280, Série D pp. 1177-1180.
- BERNY, H.; BSIRI, N.; CHARBIT, J. J.; GALY, A. M.; SOYFER, J. C.; GALY, J. P.; BARBE, J.; SHARPLES, D.; MESA-VALLE, C.; MASCARO, C.; OSUNA, A. 1992. 1,4-Dimetoxy-9(10H)-acridinone Derivatives. *Drug. Res.* 42 (I), 5, pp. 674-679-
- BITONTI, A. J.; DUMONT, J. A.; MCCANN, P. P. *Biochem. J.* 1986, 237, p. 685. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanotione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.
- BLACK, C. D. V.; WATSON, G. J.; WARD, R. J. 1977. The use of Pentostam liposomes in the chemotherapy of experimental leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, pp. 350-2.
- BLAKE, A.; PEACOCKE, A. R.; 1968. Modified Intercalation Model for the Interaction of Aminoacridines and DNA. *Nature*, 212, p. 1360.
- BOAINAIN, E.; RASSI, A. 1979. Terapeutica etiologica da doença de Chagas. *Arq. Bras. Cardiol.* 32 pp. 395-399.
- BOHRINGER, S., HECKER, H. 1975. Quantitative ultrastructural investigations of the life cycle of *T. brucei*: A morphometric analysis. *J. Protozool.* 22 pp. 463-467,
- BORELLI, D. 1987. A clinical trial of itraconazole in the treatment of deep mycoses and leishmaniasis. *Rev. Infect. Diseas.*, 9 (1), pp. 557-70.
- BOROVSKY, P. F. 1898. (Edit.) On sart sore voenno-medicinskij zurnal. 195, (11), pp. 925-41.
- BORST, P. 1986. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 701-732. Citado por OPPERDOES, F. R.; MICHELS, A. M. 1989. Evolutionary Origin of Peroxisomes. pp. 187-195. En: *Organelles in Eukaryotic Cells*. Tager y col. edit. Plenum Publishing Corporation, 1989. Italy.
- BORST, P.; SWINKELS, B. W. 1989. The evolutionary origin of glycosomes; how glycolysis moved from cytosol to organelle. *NATO ASI Series*.
- BORST, P. 1977. Metabolism and Chemotherapy of African trypanosomes. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71; pp. 3-4.
- BORST, P. 1977. *Biochim. Biophys. Acta* 866; pp. 179-203. Citado por BORST, P.; SWINKELS, B. W. 1989. The evolutionary origin of glycosomes; how glycolysis moved from cytosol to organelle. *NATO ASI Series*.

- BOVERIS, A.; DOCAMPO, R. ; TURRENS, J. E.; STOPPANI, A. O. M.; 1977. Acción de la Beta y alfa lapachone sobre la producción de H<sup>2</sup>O<sup>2</sup> y el crecimiento de *T. cruzi*. Rev. Socied. Argent. Micro., 9 (2) pp. 54-61.
- BOVERIS, A.; STOPPANI, A. O. M.; 1977. Hydrogen peroxide generation in *T. cruzi*. *Experientia*, 33 pp. 1306.
- BOWMAN, I. B. R. , FLYNMAN, I. 1986. In *Biology of the Kinetoplastida*, ed. W. H. R. Lumsden, D. A. Evans, 1; pp. 435-476. New York: Academic.
- BOWMAN, I. B. R.; TOBIE, E. J.; VON BRAND, T. 1963. CO<sub>2</sub>-fixation studies with the culture form of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 9, pp. 105-114.
- BOWMAN, I.B.R. 1974. Intermediary metabolism of pathogenic flagellates, in : *Trypanosomiasis and Leishmaniasis with Special Reference to Chagas` Disease*. Ciba Found Symp. Associated Scientific Publishers, Amsterdam, 20 (new series): pp. 255-271.
- BOWMAN, I. B. R. 1974. Intermediary metabolism of pathogenic flagellates. In: *trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas` disease*. CIBA Foundation Symposium, 20 (new series) pp. 255-71.
- BOWMAN, I.B.R.; TOBIE, E. J.; Von BRAND, T. 1963. CO<sub>2</sub> fixation studies with the culture form of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 9, pp. 105-114.
- BRADLEY, D. F.; WOLF, K. 1959. Aggregation of Dyes Bound to Polyanions. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* 45, p. 944.
- BRENER, Z. 1973. *Biology of Trypanosoma cruzi*. *A. Rev. Microbiol.* 27; pp. 347-382.
- BRENER, Z.; COSTA, C. A. G. y CHIARI, C.; 1976. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 18 pp. 450-455.
- BRENER, Z.; 1961. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood stream of normal and immune mice. *Am. Trop. Med. Parasit.*, 63 pp. 215-220.
- BRENNER, S. L.; BARNETT, F. H.; CRICK, C.; ORGEL, A. 1961. *The Theory of Mutagenesis*. *J. Mol. Biol.* 3, p. 121.
- BROMAN, K. , ROPARS, M. , DESHUSSES, I . 1982. Subcellular location of glycolytic enzymes in *T. brucei* culture form. *Experientia* 38; pp. 533-534 .
- BROMAN, K. , KNUPFER, A. L. , ROPARS, M. , DESHUSSES, J . 1983. Occurrence and role of phosphoenolpyruvate carboxykinase in procyclic *T. brucei brucei* glycosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 8; pp. 79-87.
- BROWNING, C. H. 1937. Chemotherapeutic Antiseptics. *Edinburgh Med. J.* 44; p. 497.

BIBLIOGRAFIA

- BRUN, R.; SCHONENBERGER, M. 1981. Stimulating effect of citrate and cis-aconitate on the transformation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms to procyclic forms in vitro. Z. Parasitenkd. 66; pp. 17-24.
- BRYCESON, A. D. M.; CHULAY, J. D.; MUGAMBI, J.; WERE, J. B.; GACHIHI, G.; CHUNGE, C. N.; MUIGAI, R.; BHATT, S. M.; Ho, M.; SPENCER, H. C.; MEME, J.; ANABWANI, G. 1985. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs, II: Response to high dose sodium stibogluconate or prolonged treatment with pentamidine. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 62; pp. 152-3.
- BRYCESON, A. D. M. 1968. Pentamidine-induced diabetes mellitus. East Afr. Med. J., 45 pp. 110-7.
- BRYCESON, A. D. M. 1970. Diffuse cutaneous leishmaniasis: II Treatment. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 64 pp. 369-79.
- BUCHINGER, G. 1969. The Effect of Trypaflavine Alone in Combination with visible light on chromosomes of HeLa cells and Human Leukocytes. Human Genetik. 7, p. 323.
- BUCHINGER, G. 1970. Mutagenicity Experiments with mice and Human cell cultures: treatment with an acridine derivative (trypaflavine). In: F. VOGEL and G. ROHRBORN (Eds.), Chemical Mutagenesis in Mammals and Man, pp. 350-366. Springer, Heidelberg.
- BUIATTI, M.; RAGAZZINI, R. 1966. Mutagenic Effect of Acridine Orange in Totamo. Mutation Res. 3; p. 360.
- BUN-HOI, N. P.; LACASSAGNE, A.; LECOCQ, J.; RUDALI, G. 1945. Antagonistic action of different benzacridines toward the cancerogenic action of methylcholanthrene. C. R. Soc. Biol. 139, p. 485.
- BURGESS, J. L.; BIRCHALL, R. 1972. Nephrotoxicity of amphotericin B, with emphasis on changes in tubular function. Amer. J. Med., pp. 53-57.
- BURNY, A., GRAS, H., TARTAR, A. 1988. Nature 332; pp. 454-455. Citado por: BUSOLO, F.; CONVENTI, L.; GRIGOLON, M.; PALU, G. 1991. Nucleoside uptake in macrophages from various murine strains: A short time and two-step stimulation model. Biochem. Biophys. Res. Commun. 177 (3) pp. 1299-305.
- BUSOLO, F.; CONVENTI, L.; GATTI, C.; MONTI, D.; TROIANO, L.; FRANCESCHI, C. 1989. Biochem. Biophys. Res. Commun., 160, pp. 354-361. Citado por: BUSOLO, F.; CONVENTI, L.; GRIGOLON, M.; PALU, G. 1991. Nucleoside uptake in macrophages from various murine strains: A short time and two-step stimulation model. Biochem. Biophys. Res. Commun. 177 (3) pp. 1299-305.
- BUSOLO, F.; CONVENTI, L.; GRIGOLON, M.; PALU, G. 1991. Nucleoside uptake in macrophages from various murine strains: A short time and two-step stimulation model. Biochem. Biophys. Res. Commun. 177 (3) pp. 1299-305.
- BYEFELD, J. E.; SOGERBAUM, O. H. 1966. Analyt. Biochem. 17, p. 434. Citado por RODRIGUEZ-CABEZAS, M. N. 1991. Tesis Doctoral. Estudio y Caracterización de Proteínas de *T. cruzi* susceptibles de producir cambios en su célula hospedadora. Universidad de Granada. Granada. España.

- CACERES, O.; FERNANDES, J. F. 1976. Glucose metabolism, growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Brasil. Biol. 36; pp. 397-410.
- CAIN, B. F.; SEELYE, R. N.; ATWELL, G. J. 1974. Potential Antitumor Agents. 14-acridinyl-methane-sulfonanilides. J. Med. Chem. 14, p. 922.
- CAIN, B. F.; ATWELL, G. J. 1976. Potential Antitumor Agents. 19-multiply substituted 4'-(9-acridinylamine)methane sulfoanilide. J. Med. Chem. 19, p. 1124.
- CALLENS, M., KUNT, D. A., OPPERDOES, F. R. 1991. Mol. Biochem. Parasitol. 47(1); pp. 19-29. Citado por CAZZULLO, J. J. 1992. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. FASEB J. 6, pp. 3153-3161.
- CANÇAO, J. R.; 1981. Agranulocitosis pelo Benzonidazol. Pesquisas Basicas en Doença de Chagas. VIII Reuniao Anual, Caxambu, Brasil, p. 66.
- CANÇAO, J. R.; SALGADO, A. A.; MARRA, U. D.; ALVARES, J. M. y MACHADO, J. R.; 1975. Ensaio terapêutico clinico na doença de Chagas cronica con o Nifurtimox en tres esquemas de duração prolongada. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo; 17 pp. 111-125.
- CANNATA, J. J. B., VALLE, E., DOCAMPO, R. CAZZULLO, J. J. 1982. Subcellular localisation of phosphoenol pyruvate carboxykinase in the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. Mol. Biochem. Parasitol. 6; pp. 151-160.
- CANNATA, J. J. B.; CAZZULLO, J. J. 1984. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol. 79 B; pp. 297-308.
- CARDONI, R. L.; RIMOLDI, M. T. y DE BRACO, M. M. E.; 1977. *Trypanosoma cruzi*: Nifurtimox's effect on infectivity. Exp. Parasitol.; 43 (2) pp. 372-375.
- CARSON, D. A.; CHANG, K. P. 1981. Phosphorilation and antileishmanial activity of formycin B. Biochemical biophysical Research Communications, 100, pp. 1377-83.
- CASCALES, C.; CRACIUNESCU, D.; MARTIN-SANZ, P.; CASCALES, M. 1982. Effect rhodium complexes on experimental carcinogenesis in liver of rats treated with thioacetamide (TAM). Fourth International Symposium on platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy.
- CASTANYS, S.; OSUNA, A.; GAMARRO, F.; RUIZ-PEREZ, L. M. 1984. Purification of metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* by Percoll discontinuous gradient centrifugation. Z. Parasitenkd. 70; pp. 443-449.
- CASTANYS-CUELLO, S.; OSUNA-CARRILLO, A.; GAMARRO-CONDE, F.; RUIZ-PEREZ, L. M.; JERONIMO-GONZALEZ, N.; JERONIMO-GONZALEZ, M. C.; FERNANDEZ-BRAÑA, M.; MARTINEZ-ROLDAN, C. Acción "in vivo" de tres derivados benzo (de) isiquinolil-1,3-diona sobre *Trypanosoma cruzi*. Laboratorio. Vol. 77, 459, pp. 177-187.



BIBLIOGRAFIA

CASTILLA CALVENTE, J. J.; MESA VALLE, C.; CRACIUNESCU, D.; OSUNA, A. Inhibición del crecimiento ejercida por complejos metálicos de nueva síntesis de IrIII y RhIII sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* y promastigotes de *L. donovani*. Abs. B. X Cong. Lat. Paras. Montevideo. Uruguay.

CASTILLA CALVENTE, J. J.; MESA, C. M.; CRACIUNESCU, D. G.; OSUNA, A. 1991. Valoración "in vitro" del efecto ejercido por productos de nueva síntesis de Pt(II) y Pt(IV) sobre el crecimiento de formas epimastigotes de *T. cruzi*. Abs. B. X Cong. Lat. Paras. Montevideo. Uruguay.

CASTILLA CALVENTE, J. J.; MESA-VALLE, C.; SBIHI, Y.; BARBE, J.; OSUNA, A. 1993. Utilization of radioactive labelling for "in vitro" screening with three newly synthesized acridine derivatives against *T. cruzi*. Mediter. J. Infect. Parasit. Dis. p. 133.

CASTILLA CALVENTE, J. J.; MESA VALLE, C.; RODRIGUEZ, N.; ARNEDO, T.; BARBE, J.; OSUNA, A. 1993. "In vitro" action of three acridine derivatives against epimastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, including a [<sup>1</sup>H] NMR study of alterations in the metabolite production. Abs. B. IX Internat. Cong. Prot. Berlin.

CASTILLA CALVENTE, J. J.; MESA-VALLE, C.; SANCHEZ-MORENO, N.; ARNEDO, T.; RODRIGUEZ, N.; MORALEDA, V.; BARBE, J.; OSUNA, A. 1993. Ultrastructural study of the action of the acridine derivatives on HeLa cells. Abs. B. 2nd Congress of COST ACRIVAL antiparasitic Chemotherapy. Budapest.

CASTILLA CALVENTE, J. J.; MESA-VALLE, C.; RODRIGUEZ, N.; LAZUEN, J.; MORALEDA, V.; BARBE, J.; OSUNA, A. 1993. Analysis of the preventative effect of the newly synthesized acridine derivatives on blood banks infected with *T. cruzi*. Abs. B. 2nd Congress of COST ACRIVAL antiparasitic Chemotherapy. Budapest.

CASTILLA-CALVENTE, J. J.; SANCHEZ-MORENO, M.; MESA-VALLE, C.; OSUNA, A. 1994. The "in vitro" culture of *L. donovani* and [<sup>1</sup>H]NMR characterization of its amastigote-like forms. Mol. Cell. Biochem. Aceptado para publicación, Febrero de 1994.

CATALDI De FLOMBAUM, M. A.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J.; SEGURA, E. L. 1977. CO<sub>2</sub>-Fixing enzymes in *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol., 58B, pp. 67-69.

CAZZULO, J. J.; VALLE, E.; DOCAMPO, R.; CANNATA, J. J. B. 1980b. Intracellular distribution of carbon dioxide-fixing enzymes in *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. J. Gen. Microbiol., 117, pp. 271-274.

CAZZULO, J. J. 1984. Protein and amino acid catabolism in *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol. 79B; pp. 309-320.

CAZZULO, J. J.; FRANKE De CAZZULO, B. M.; SEGURA, E. L.; 1980a. Inhibition of the NAD-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* by sulphhydryl reagents. Comp. Biochem. Physiol., 67B, pp. 163-170.

CAZZULO, J. J.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; ENGEL, J. C.; CANNATA, J. J. B. 1985. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in Trypanosomatids, Molec. Biochem. Parasitol. 16; pp. 329-343.

- CAZZULO, J. J.; DE CAZZULO, B. M. F.; ENGEL, J.C.; CANNATA, J. J. B. 1985. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in Trypanosomatids. *Mol Biochem. Parasitol.* 16; pp. 329-43.
- CAZZULO, J. J. 1977. Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in *T. cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 56 B, pp. 301-3.
- CAZZULLO, J. J. 1992. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB J.* 6, pp. 3153-3161.
- CLARK, A. 1953. The Mutagenic Activity of Dyes in *Drosophila Melanogaster*. *Am. Nat.* 87, 295.
- CLARKSON, A. B. , BROHN, F. H. 1976. Trypanosomiasis: An approach to chemotherapy by inhibition of carbohydrate metabolism. *Science* 194; pp. 204-206.
- CLAYSON, D. B. 1973. Carcinogenic and Anticarcinogenic Properties of Acridines. *Chem. Heterocycl. Compounds*, 9, p. 815.
- CLAYTON, C. E. 1985. Import of fructose biphosphate aldolase into the glycosomes of *T. brucei*. *EMBO J.* 4; pp. 2999-3003.
- CLAYTON, C. E. 1987. *J. Cell. Biol.* 105; pp. 2649-2653. Citado por CLAYTON, C. E. 1985. Import of fructose biphosphate aldolase into the glycosomes of *T. brucei*. *EMBO J.* 4; pp. 2999-3003.
- CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. 1985. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16; pp. 315-327.
- COOMBS, G. H. 1982. Proteinases of *L. mexicana* and other flagellate protozoa. *Parasitol.*, 84, pp. 149-55.
- COOMBS, G. H. ; BAXTER, J. 1984. Inhibition of *Leishmania* amastigote growth by antipain and leupeptin. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78, pp. 21-4.
- COOMBS, G. H. , TETI, E. L. , MOSS, V. A. , VICKERMAN K. 1986. *Parasitol.*, 92: 13-23. Citado por CASTILLA-CALVENTE, J. J.; SANCHEZ-MORENO, M.; MESA-VALLE, C.; OSUNA, A. 1994. The "in vitro" culture of *L. donovani* and [<sup>1</sup>H]NMR characterization of its amastigote-like forms. *Mol. Cell. Biochem.* Aceptado para publicación, Febrero de 1994.
- COONS, T.; HANSON, S.; BITONTI, A. J. 1989. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35, p. 43. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanosome Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.
- COX, B. A.; FIRTH III, W. J.; HICKMAN, S.; KLOTZ, F. B.; YIELDING, K. L.; 1981. Antitrypanosomal action enhanced by photoaffinity labeling with ethidium analogs. *J. Parasitol.*, 67 (3) pp. 410-416.

## BIBLIOGRAFIA

---

CRACIUNESCU, D. G.; PARRONDO, E.; GASTON DE IRIARTE, E.; GHIRVU, C. 1988. Estudio de las actividades farmacológicas duales y de la nefrotoxicidad de algunos nuevos complejos de Ru(II) e Ir(II). *An. Real Acad. Farm.* 54, pp. 46-69.

CRACIUNESCU, D. 1977. Interacciones moleculares entre los aniones complejos de los metales de transición y bases orgánicas nitrogenadas de importancia biológica. *An. R. Acad. Farm.*, 2.

CRACIUNESCU, D. G.; PARRONDO-IGLESIAS, E.; DOADRIO, A.; RUIZ-PEREZ, L. M.; OSUNA, A.; ERCOLI, N.; GASTON DE IRIARTE, E. 1989. Complejos del Rh(III) de acción antitripanosómica. *An. Real Acad. Farm.* 55, pp. 213-36.

CRACIUNESCU, D.; DOADRIO, A.; FURLANI, A.; SCARCIA, V. 1983. Relationship for the Rh(III) complexes with sulphonamide and thiazole derivatives. *An. Real Acad. Farmacia.* 49., pp. 515-31.

CRACIUNESCU, D.; DOADRIO, A.; FURLANI, A.; SCARCIA, V. 1982. Structure antitumours activity relationship for new Platinum complexes. *Chem. Biol. Interactions* 42: pp. 153-164.

CRACIUNESCU, D. G.; PARRONDO-IGLESIAS, E.; MOLINA, C.; DOADRIO-LOPEZ, A.; GASTON DE IRIARTE, E.; GHIRVU, C. 1988. Estudio de las actividades farmacológicas duales (actividades antitripanosómicas y actividades antitumorales) y de la nefrotoxicidad de algunos nuevos complejos de Ru(II) e Ir(II) donde L=derivado de alquil o aril ditiocarbamato y/o xantato. *An. Real Acad. Farm.*, 54, pp. 46-69.

CRACIUNESCU, D. G.; MOLINA, C.; ALONSO, M. P.; PARRONDO IGLESIAS, E.; DOADRIO LOPEZ, A.; DOADRIO-VILLAREJO, J. C.; GASTON DE IRIARTE, E.; GHIRVU, C. I.; ERCOLI, N. 1990. Estudio de las actividades farmacológicas duales (antitumorales y antitripanosómicas) y del perfil toxicológico de algunos nuevos complejos del Rh(I) y del Ir(I). *An. Real Acad. Farm.* 56, pp. 181-200.

CRACIUNESCU, D.; MOLINA, C.; CARVAJAL, R. M.; DOADRIO-LOPEZ, A.; BERGER, M.; GHIRVU, C. 1986. Estudio de las actividades antitumorales y/o antitripanosómicas de dos nuevas series de complejos del Pt(II): cis-Pt(L)<sub>2</sub>(Br)<sub>2</sub> (donde L=derivado de tiazol y/o derivado de sulfonamida) y cis-Pt(L)(X) (donde n= 1 o 2; L = 1,2-Diaminociclohexano. *An. Real Acad. Farm.*, 52, pp. 45-64.

CRACIUNESCU, D. G.; MOLINA, C.; DOADRIO, A.; PARRONDO, E.; GOMEZ, A.; SANCHEZ DE LEON, M.; GASTON DE IRIARTE, E.; GHIRVU, C. 1987. Síntesis y caracterización estructural, estudio de las propiedades duales (actividades antitumorales y actividad antitripanosómica) y evaluación de la nefrotoxicidad de algunos nuevos complejos (Rh(III) (L)<sub>3</sub>), donde L=derivado de alquil o aril. *An. Real Acad. Farm.*, 53, pp. 205-32.

CRACIUNESCU, D.; DOADRIO, A.; FURLANI, A.; SCARCIA, V. 1983. Relationship for the Rh(III) complexes with sulphonamide and thiazole derivatives. *An. Real Acad. Farmacia,* 49, pp. 515-31.

CRACIUNESCU, D.; GHIRVU, C.; DOADRIO, A. 1983. Structure-activity relationships for the Rh(III) complexes with sulphonamide and thiazole derivatives. *An. R. Acad. Farm.* 49, pp. 515-531.

- CRACIUNESCU, D. G.; PARRONDO, E.; ALONSO, M. P.; MOLINA, C.; DOADRIO, A.; GOMEZ, A.; MOSQUEIRA, R. M.; GHIRVU, C.; GASTON DE IRIARTE, E. 1988. Síntesis, caracterización estructural, estudio de las propiedades estructurales (actividades antitumorales y antitripanosómicas) y evolución de la nefrotoxicidad de algunos nuevos complejos de OsIII y RuIII. An. Real Acad. Farm. 54, pp. 16-45.
- CRACIUNESCU, D. G.; MOLINA, C.; PARRONDO IGLESIAS, E.; ALONSO, M. P.; DOADRIO-VILLAREJO, J. C.; GUTIERREZ-RIOS, M. T.; GASTON DE IRIARTE, E.; GHIRVU, C. I.; CERTAD FOMBONA, G. 1990. Complejos catiónicos del Rh(III) y del Ir(III) con los medicamentos antimaláricos; actividades farmacológicas duales "in vivo" (antitumorales y antitripanosómicas). An. Real Acad. Farm. 56, pp. 453-468.
- CRANE, M. U.; DVORAK, J. A. 1979. *T. cruzi*: interaction with vertebrate cells. DNA synthesis and growth of intracellular amastigotes and their relationship to host cell DNA synthesis and growth. J. Protozool. 26, pp. 599-604.
- CROFT, S. L. 1988. Recent developments in the chemotherapy of leishmaniasis. Trends Pharmacol. Sci. 9 pp. 376-381.
- CROFT, S. L.; NEAL, R. A.; CRACIUNESCU, D. G.; CERTAD-FOMBONA, G. 1991. The activity of Pt, Ir and Rh drug complexes against *L. donovani*. Com. Personal.
- CRONIN, C.N., TIPTON, K.F. 1987. Biochem. J. 247; pp. 41-46. Citado por: OPPERDOES, F. R.; WIERENGA, R. K.; NOBLE, M. E. M.; HOL, W. G. J.; WILLSON, M.; KUNTZ, D. A.; CALLENS, M.; PERIE, J. 1990. Unique Properties of Glycosomal Enzymes. En: Parasites: Molecular Biology, Drug and Vaccine Design, pp. 233-246. Wiley-Liss, Inc.
- CRONIN, C.N., TIPTON, K.F. 1985. Biochem. J. 227; pp. 113-124. Citado por: CRONIN, C.N., TIPTON, K.F. 1987. Biochem. J. 247; pp. 41-46. Citado por: OPPERDOES, F. R.; WIERENGA, R. K.; NOBLE, M. E. M.; HOL, W. G. J.; WILLSON, M.; KUNTZ, D. A.; CALLENS, M.; PERIE, J. 1990. Unique Properties of Glycosomal Enzymes. En: Parasites: Molecular Biology, Drug and Vaccine Design, pp. 233-246. Wiley-Liss, Inc.
- CRUZ, F. S.; BERGTER, E. B.; MARR, J.; DE SOUZA, W.; LEON, N.; 1981. Lipid accumulation induced by allopurinol in *T. cruzi*. Pesquisas Basicas en Doença de Chagas. VIII Reuniao Anual, Caxambu, Brasil, p. 32.
- CRUZ, F. S.; MARR, J.; BERENS, R. L.; 1980. Prevention of transfusion-induced Chagas' disease by amphoteracin B. Am. J. Trop. Med. Hyg.; 29 (5) pp. 761-765.
- CUNNINGHAM, D. D. 1885. On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue culture of a specimen of Delhi boil. Scientific Memoirs by Medical Officers of the Army of India. 1, pp. 21-31.
- CHAKRABORTY, A. K.; MAJUMDER, H. K. 1987. Decatenation of kinetoplast DNA by an ATP-dependent DNA topoisomerase from the kinetoplast hemoflagellate *L. donovani*. Mol. and Biochem. Parasitol. 26, pp. 215-224.
- CHANG, K. P. 1980. Human cutaneous *Leishmania* in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. Science, 209, pp. 1240-1242.

## BIBLIOGRAFIA

---

- CHANG K.-P. & HENDRICKS, L. D. 1985. Laboratory cultivation and maintenance of *Leishmania*. In: Chang, K.-P. & Bray, R.S. (ed.), *Leishmaniasis*. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), New York, New York, pp. 213-244.
- CHANG, S. L. 1948. Studies on hemoflagellates. IV Observations concerning some biochemical activities in culture and respiration of the three species of *Leishmania* and *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.* 82, pp. 109-18.
- CHANG, K. P., AND DWYER, D. M. 1976. Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science* 193; pp. 678-680.
- CHAPMAN, W. L. Jr.; HANSON, W. L.; WAITS, V. B.; KINNAMON, K. E. 1979. Antileishmanial activity of selected compounds in dogs experimentally infected with *L. donovani*. *Rev. Inst. Med. Trop.*, Sao Paulo, 21 pp. 189-93.
- CHULAY, J. D.; SMITH, D. H.; PAMPLIN III, C. L. 1988. Pharmacokinetics of antimony during treatment of East African kala-azar with sodium stibogluconate and N-methyl glucamine antimoniate. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82 (1) pp. 69-72.
- CHULAY, J. D.; FAWCETT, D. W.; CHUNGE, C. N. 1985.a. Electron microscopy of *L. donovani* in splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis during treatment with sodium stibogluconate. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 79 (4) pp. 417-29.
- D'AMATO, F. 1950. Mutagenic Action of Acridine and its Derivatives. *Caryologia*, 2, p. 229.
- D'AMATO, F. 1954. A Survey of Acridines for Chromosome Breaking (mutagenic) Action in *Allium*. *Proc.9th Int. Congr. Genet.*; pp. 831-35.
- D'AMATO, F. 1952. Mutagenic Activity of Acridines. *Caryologia*, 4; p. 388.
- D'ARCY, P. F.; SCOTT, E. M.; 1977. Antifungal agentes. *Prog. Drug. Res.* 21 pp. 93-147.
- DA COSTA, A.; POITMAN, A.; 1977. Effect of Ethidium bromide on the oxidative metabolism and enzyme profiles of *C. fasciculata*. *J. Protozool.*, 24 (1) pp. 192-195.
- DAGGER, F.; AYESTA, C.; HERNANDEZ, A. G. 1984. The effect of tunicamycin on *L. braziliensis* cell growth, cell morphology and ultrastructure. *Biol. Cell.*; 50; pp. 173-80.
- DARLING, T. N., BALBER, A. E. AND BLUM, J. J. (1988). A comparative study of D-lactate, L-lactate and glycerol formation by four species of *Leishmania* and by *Trypanosoma lewisi* and *Trypanosoma brucei gambiense*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30; pp. 253-258.
- DARLING, T. N., AND BLUM, J. J. 1987. In vitro reversible transformation of *Leishmania brasiliensis panamensis* between promastigotes and ellipsoidal forms. *J. Protoz.* 34; pp. 166-168.
- DARLING, T. N., DAVIS, D. G., LONDON, R. E. & BLUM, J. J. 1989. Metabolic interactions between glucose, glycerol, alanine, and acetate in *Leishmania braziliensis panamensis promastigotes*. *J. Protozool.*, 36; pp. 217-225.

- DE MARS, R. I. 1953. Chemical Mutagenesis in Bacteriophage T2. *Nature*, 172, p. 964.
- DE SOUZA, W.; CARVALLO, T. V.; BENCHINOL, M. 1978. *T. cruzi*: ultraestructural, cytochemical and free-fracture studies of protein uptake. *Exp. Parasitol.*, 45, pp. 101-115.
- DE SOUZA, W.; CHIARI, E. 1977. Fine structure of the trypomastigote forms of *T. cruzi* isolated from a cellular culture by passage in column. *Rev. Brasi. Biol.*, 37; pp. 671-75.
- DE DUVE, C. 1982. *Ann. NY Acad. Sci.* 386; pp. 1-4. Citado por: OPPERDOES, F. R.; MICHELS, A. M. 1989. Evolutionary Origin of Peroxisomes. pp. 187-195. En: *Organelles in Eukaryotic Cells*. Tager y col. edit. Plenum Publishing Corporation, 1989. Italy.
- DE SOUZA, W.; GYNBERG, N.; NERY-GYIMARAES, F. 1975. Aspectos ultraestruturais de forma epimastigota do *T. cruzi* en medio LIT. *Rev. Soc. Brasi. Med. Trop.*, 9, pp. 143-156.
- DE SOUZA, W. 1976. Associations membranen microtubules chez *T. cruzi*. *J. Micros. Biol. Cellul.*, 25: pp. 189-90.
- DE LOS SANTOS, C.; BULDAIN, G.; FRYDMAN, B.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. 1985. Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of glucose metabolism in *Crithidia fasciculata*. Evidence of CO<sub>2</sub> fixation by phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Eur. J. Biochem.* 149; pp. 421-429.
- DE BOISO, J. F.; STOPPANI, A. O. M. 1973. The mechanism of acetate and pyruvate oxidation by *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* 20; pp. 673-678.
- DECKER-JACKSON, J. E.; HONIGBERG, B. M. 1978. Glycoproteins Released by *L. donovani*: Immunologic relationships with host and bacterial antigens and preliminary biochemical analysis. *J. Protoz.*, 25, pp. 514-25.
- DEHAND, J.; JORDANOV, J. 1976. Antitumour activity Rh(III) complexes. *Inorgan. Chim. Acta.* 17, p. 37.
- DELAIN, E.; RIOU, G. 1969. Ultrastructure du DNA du kinetoplasto de *T. cruzi* cultivé "in vitro". *Comp. Rend. Acad. Sciences, Paris.* 268, serie D: pp. 1225-27.
- DELAIN, E.; BRACK, CH.; LACOME, A.; RIOU, G. 1972. Organization of the DNA in the kinetoplast of *Trypanosomatidae*. In: *Comparative Biochemistry of Parasites*, Academic Press. pp. 167-187.
- DEMEREK, M. 1949. Chemical Mutagens. *Proc.8th Int. Congr. Genet. Hereditas Suppl.* p. 201.
- DEMEREK, M.; BERTANI, G.; FLINT, J. 1951. A Survey of Chemicals for Mutagenic Action in *E. Coli*. *Am. Nat.* 85; p. 119.
- DENNY, W. A.; ATWELL, G. J.; BAGULEY, B. C. 1984. Potent Antitumor Agents. 40-Orally Active 4,5 Disubstituted derivatives of Amsacrine. *J. Med. Chem.* 363, 367.
- DIAZ RIVADENEYRA, J. 1993. Tesis Doctoral. Introducción al conocimiento de la Cryptosporidiasis bovina. Universidad de Granada. Granada. España.

## BIBLIOGRAFIA

---

- DIEDERICH, J.; LODEMAN, E.; WALKER, A. 1973. Basic Dyes as Inducers of Interferon-like Activity in Mice. Arch. Gesamte Virusforsch., 40, p. 82.
- DOCAMPO, R.; BOISO, J. F.; STOPPANI, A. O. M.; 1978,a. Tricarboxylic acid cycle operation at the kinetoplast-mitochondrion complex of *T. cruzi*. Biochem. Biophys. Acta, 502 pp. 466-467.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. ; TURRENS, J. F.; KATZIN, A. M.; GONZALEZ-CAPPA, S. M.; STOPPANI, A. O. M.; 1981. Biochemical and ultrastructural alterations produced by miconazol and econazole in *T. cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 3 pp. 169-180.
- DOCAMPO, R.; GADELHA, F. R.; MORENO, S. N. J. 1991. Metabolism and Mode of Anti-*Trypanosoma cruzi* action of gentian violet. In: Molecular and immunological aspects of parasitism. C.C. Wang Eds. American Association for the Advancement of Science.
- DOCAMPO, R.; 1979. Toxicity mechanism of naphthoquinones for *T. cruzi*. Rev. Bras. Pesqu. Med. Biol. 3 pp. 35-40.
- DOCAMPO, R. , DEBOISO, J. F. , BOVERIS, A. , STOPPANI A, O. M. 1986. Localization of peroxidase activity in *Trypanosoma cruzi* microbodies. Experientia 32; pp. 972-975.
- DOCAMPO, R. y STOPPANI, A. O. M.; 1979. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. Arch. Biochem. Biophys. USA, 197 (1) pp. 317-321.
- DOCAMPO, R.; LOPES, J. N.; CRUZ, F. S.; DE SOUZA, W.; 1977. Ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by Beta-lapachone. Exp. Parasitol., 42 pp. 142-149.
- DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; CRUZ, F. S.; 1978, b. Ultrastructural alterations and peroxide formation induced by naphthoquinones in different stages of *T. cruzi*. Z. Parasitenkd., 57 (3) pp. 189-198.
- DOCAMPO, R. y STOPPANI, A. O. M.; 1980. Sobre el mecanismo de acción tripanocida del Nifurtimox y otros nitroderivados en *Trypanosoma cruzi*. Med. Buenos Aires, 40 (Supl. 1), pp. 10-16.
- DONOVAN, C. 1903. On the possibility of the occurrence of tripanosomiasis in India. British Med. J. 2, p. 79.
- DOVEY, H. F. , PARSONS, M. , WANG, C. C. 1988 Procc. Nat. Acad. Sc. USA 85; pp. 2598-2602. Citado por: OPPERDOES, F. R.; MICHELS, A. M. 1989. Evolutionary Origin of Peroxisomes. pp. 187-195. En: Organelles in Eukaryotic Cells. Tager y col. edit. Plenum Publishing Corporation, 1989. Italy.
- DOYLE, P. S., ENGEL, J. C., PIMENTA, P. F. P., DA SILVA, P. P., AND DWYER D. M. 1991. Leishmania donovani: Long-Term Culture of Axenic Amastigotes at 37 °C. Exper. Parasitol. 73; pp. 326-334.
- DRUMMOND, D. S.; SIMPSON, V. F. W.; GILDEMEISTER, X; PEACOCKE, A. R. 1965. Interaction of aminoacridines with Deoxyribonucleic Acid: Effects of Ionic Strength, Denaturation and Structure. Biopolymers. 3; p. 135.

- DULBECCO, R.; VOGT, N. 1958. Studies on the Induction of Mutations in Poliovirus by Proflavine. *Virology*, 5; p. 236.
- DUNCAN, K.; WALSH, C. T. 1988. *Biochem.* 27, p. 3709. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanotione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.
- DWYER, D. M.; GOTTLIEB, M. 1983. Citado por CHANG, K. P.; FONG, D.; BRAY, R. S. en *Leishmaniasis* (Chang/Bray, eds.) 1985.
- EHRENBERG, L.; GUSTAFSON, A.; LUNDQUIST, U. 1956. Chemically Damage in Human Diploid Cells Following Activation of Lysosomal enzymes. *Nature*, 207, p. 1170.
- EHRlich, P.; GUTTMAN, P. 1891. *Klin. Wochenschr.* 28, p. 953. Citado por MESA-VALLE, C. 1991. Tesis Doctoral. Quimioterapia experimental frente a la leishmaniosis visceral. Universidad de Granada. Granada. España.
- EL SAALEE, L.; KHALIFA, T.; SALEH, A. 1986. Fouadin and metronidazole combination in cutaneous leishmaniasis. *J. Fac. Med. Baghdad*, 28 (2) pp. 11-8.
- EL-ON, J.; RUBINSTEIN, N.; KERNBAUN, S.; SCHNUR, L. F. 1986. "In vitro" and "in vivo" anti-leishmanial activity of chlorpromazine alone and combined with N-meglumine antimonate. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 80 (5) pp. 509-17.
- ELION, G. B.; CALLAHAN, S.; RUNDLES, R. W.; HITCHINGS, G. H. 1963. Relationship between metabolic fates and antitumor activities of thiopurines. *Cancer Res.*, 23 p. 1207.
- ENGLUND, P.T. 1981. In *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, ed. M. Levandowsky, S. H. Hutner, pp. 333-383. New York: Academic.
- ENGLUND, P.T. , HAJDUK, S.L. , MARINI, J.C. 1982. The molecular biology of trypanosomes. *Ann. Rev. Biochem.* 51; pp. 695-726.
- EPERON, S., AND MCMAHON-PRATT, D. 1989a.I. Extracellular cultivation and morphological characterization of amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *Leishmania brasiliensis*. *J. Protoz.* 36; pp. 502-510.
- EPERON, S., AND MCMAHON-PRATT, D. 1989b. Estracellular amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *L. brasiliensis*. II. Stage -and species- specific monoclonal antibodies. *J. Protoz.* 36; pp. 510-518.
- EPHRUSSI, B., L'HERIZIER P., HOTTINGUER, H. 1949. Action de l'acriflavine sur les levures. *Ann. Inst. Pasteur*, 77. p. 64.
- EPHRUSSI, B.; HOTTINGER, H.; CHIMINES, M. 1949. Action de l'Acriflavine sur les Levures. I. La Mutation "Petite Colonie". *Ann. Inst. Pasteur*, 76, p. 351.



BIBLIOGRAFIA

---

ESCARIO, G<sup>a</sup>-TREVIANO, J. A.; GOMEZ-BARRIO, A. 1992. Modelos de Protozoos para el cribado farmacológico experimental. En: Avances En... Parasitología . Protozoología . Editado por la Universidad de Santiago de Compostela y coordinado por el Dr. M. L. SANMARTIN DURAN.

FAIRBAIRN, D.; 1958. Trehalose and glucose in helminths and other invertebrates. *Can. J. Zool.*, 36, pp. 787-795.

FAIRLAMB, A. H.; HENDERSON, G. B. 1987. Metabolism of trypanothione and glutathionylspermidine in trypanosomatids, in *Host-Parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozoal Infections*, K. P. Chang and D. Snary, Eds. (Springer-Verlag/NATO ASI Series, vol. H11, Berlin) pp. 29-40.

FAIRLAMB, A. H.; HENDERSON, G. B.; CERAMI, A. 1986. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21, 247. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanothione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.

FAIRLAMB, A. H. 1989. *Parasitol.* 99, p. 93 (supplement). Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanothione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.

FAIRLAMB, A. H.; OPPERDOES, F. R. 1986. Carbohydrate metabolism in african trypanosomes, with special reference to the glycosome. From: *Carbohydrate Metabolism in cultured cells*. Ed. by M. J. Morgan (Plenum Publishing Corporation).

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. 1985. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14, p. 187. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanothione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.

FAIRLAMB, A. H. , OPPERDOES, F. R. 1986. In *Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells*, ed. M. J. Morgan, pp. 183-224. New York/London: Plenum.

FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanothione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.

FAIRLAMB, A. H.; BLACKBURN, P.; ULRICH, P.; CHAIT, B. T.; CERAMI, A. 1985. *Science*, 227. p. 1485. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanothione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.

FAIRLAMB, A. H. , ODURU, K. K. , BOWMAN, I. B. R. 1979. Action of the trypanocidal drug suramin on the enzymes of aerobic glycolysis of *Trypanosoma brucei* in vivo. *FEBS Spec. Meet. Enzymes*, Dubrovnik, Abstr. S4-10.

FAIRLAMB, A. H. , BOWMAN, I. B. R. 1980. *Mol. Uptake of the trypanocidal drug suramin by bloodstream forms of Trypanosoma brucei and its effect on respiration and growth rate in vivo.* *Biochem. Parasitol.* 1; pp. 315-333.

- FAIRLAMB, A.H. , OPPERDOES, F.R. , BORST, P. 1977. New approach to screening drugs for activity against African trypanosomes. *Nature* 265: 270-271.
- FARRELL, N. P.; WILLIANS, J.; McAREN, D. J. 1983. Platinum-metal complexes as dual-function agents in chemotherapy. Fourth International Symposium on Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy, Vermont, USA.
- FAYER, R.; NERAD, T.; RALL, W.; LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L. 1991. Studies on cryopreservation of *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.*, 77 (3) pp. 357-61.
- FILARDI, L. S.; LEON, W.; CRUZ, F. S.; FRAUSTO, J. 1978. Effect of the antitumor drug cis-dichlorodiamino platinum (II) on *T. cruzi* trypomastigotes. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 20, p. 248.
- FILIPSKI, J.; MARCZYNSKI, B.; CHOREAZY, M. 1975. Complexes of Acridine of 1-nitro-9-aminoacridines with DNA. *Acta Bioch. Pol.* 11, p. 119.
- FIRTH, W. J.; MESSA, A.; REID, R.; WANG, R. C.; WATKINS, C. L.; YIELDING, L. M. 1984. Identification of an acridine photoaffinity probe for trypanocidal action. *J. Med. Chem.* 27; pp. 865-870.
- FLYNN, I. W. , BOWMAN, I. B. R. 1973. The metabolism of carbohydrate by pleomorphic African trypanosomes. *Comp. Biochem. Physiol.* 45B; pp. 25-42.
- FLYNN, I. W. , BOWMAN, I. B. R. 1974. The action of trypanocidal arsenical drugs on *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma rhodesiense*. *Comp. Biochem. Physiol.* 48B; pp. 261-273.
- FORTIS, J. M.; SANCHEZ-MORENO, M.; MONTEOLIVA, M. 1982. SDS en Helminthos parásitos. *Rev. Ibér. Parasitol.*, Vol. Extra, pp. 315-324.
- FRANK, D.; BAKER, H.; HUNTER, S. H. 1970. Antagonist of growth inhibition of *Crithidia* by allopurinol, a guanine analogue. *J. Protoz.*, 17 (2); pp. 153-8.
- FREEMAN, F.; 1975. *Trypanosoma cruzi*: Antimicrobial activity and strain differentiating properties of some five- and six-membered heterocyclic compounds on trypomastigotes. *Exp. Parasitol.*, 38 (2) pp. 181-190.
- FRESHNEY, R. I. 1989. *Animal Cell Culture. A Practical Approach*. Rickwood, D. and Hames, B. D. eds. IRL PRESS. Washington. USA.
- FRITZLER M.J. 1986. Immunofluorescent Antinuclear Antibody Tests. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, third edition, pag. 733, 739. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- FROMENT, M. , HART, D. T. , OPPERDOES, F. R. 1988 . *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 97 (2) B29. Citado por :CASTILLA CALVENTE, J. J.; MESA VALLE, C.; RODRIGUEZ, N.; ARNEDO, T.; BARBE, J.; OSUNA, A. 1993. "In vitro" action of three acridine derivatives against epimastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, including a [<sup>1</sup>H] NMR study of alterations in the metabolite production. *Abs. B. IX Internat. Cong. Prot. Berlin*.

BIBLIOGRAFIA

- FUJIOKA, H.; NISHIYAMA, Y.; FURUKOWA, H.; KUMADA, N. 1989. Antimicrob. Agents Chemother. 33. Citado por :BERNY, H.; BSIRI, N.; CHARBIT, J. J.; GALY, A. M.; SOYFER, J. C.; GALY, J. P.; BARBE, J.; SHARPLES, D.; MESA-VALLE, C.; MASCARO, C.; OSUNA, A. 1992. 1,4-Dimetoxo-9(10H)-acridinone Derivatives. Drug. Res. 42 (1), 5, pp. 674-679-
- FULTON, J. D.; JOYNER, L. P. 1949. Studies on Protozoa. Part I. The metabolism of Leishman-Donovan bodies and flagellates of *L. donovani*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 43, pp. 273-86.
- GAMARRO, F.; CASTANYS, S.; RUIZ-PEREZ, L. M.; OSUNA, A. 1985. Effect of poly-L-lysine and neuraminidase on the infectivity of *T. cruzi* in cultured HeLa cells. Z. Parasitenk.
- GAMARRO, F. 1984. Tesis Doctoral: Contribución al conocimiento de las interacciones entre *T. cruzi*-célula hospedadora. Universidad de Granada. Granada. España.
- GAMARRO, F.; OSUNA, A.; CASTANYS, S.; PEREZ, M. I.; RUIZ L. M. 1985. Isolation and purification of amastigotes of *Trypanosoma cruzi* in cultured HeLa cells. Z. Parasitenkd. 71, 15-17.
- GAMBARELLI, F.; FRANCK, J.; DUMON, H. 1987. Sensitivity of *Leishmania spp* to antimonials. Use of mouse peritoneal macrophages. Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale, 67 (2) pp. 149-55.
- GARDENER, P. J.; SCHORY, L.; CHANCE, M. L. 1977. Species differentiation in the genus *Leishmania* by morphometric studies with the electron microscope. Ann. Trop. Med. Parasitol. 71, pp. 147-55.
- GASQ, M.; LAPEYSONNIE, L. 1949. Les diamidines aromatiques incidents de traitement action sur le glycémie. Med. Trop., Marseille, 9 pp. 785-804.
- GELLHOM, A.; TUPIKOVA, N. A.; VAN DYKE, H. B. 1946. The tissue distribution and excretion of four organic antimonials after single or repeated administration to normal hamsters. J. Pharm., 27 pp. 169-180.
- GEORGHIOU, S. 1975. Nature of the Interaction between Proflavine and DNA. Photochem. Photobiol. 22, p. 103.
- GEY, G. O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. 1952. Cancer Research, 12, p. 264. Ref; Hay, R., Maci, M., Chen, T. R., McClintock, and Reid, Y. (eds) 1988. American Type Culture Collection. Catalogue of cell lines and hybridomas. (6 Ed.) Rockville. Maryland (USA).
- GHISLA, S.; MASSEY, V. Eur. J. Biochem. 1989. 181, p.1. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanotione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: Molecular and Immunological Aspects of Parasitism. 1991. C.C. Wang ed. USA.
- GIBSON, W. C., OSUNA, K. A., MICHELS, P. A. M. BORST, P. 1985. Biochem. Parasitol. 16; pp. 231-242. Citado por: OPPERDOES, F. R.; MICHELS, A. M. 1989. Evolutionary Origin of Peroxisomes. pp. 187-195. En: Organelles in Eukaryotic Cells. Tager y col. edit. Plenum Publishing Corporation, 1989. Italy.

- GILBERT, M.; CLAVERIE, P. 1967. Recherches Theoriques sur l'intercalement des aminoacridines dans l'ADN. Mol. Ass. Biol. Proc. Int. Symp. Edited by Pullman. Bernard. Academic Press, N.Y.
- GILROY, F. V.; EDWARDS, M. P.; NORTON, R. S.; O'SULLIVAN, W. J. 1988. Metabolic studies of the protozoan parasite, *Cribrilina luciliae*, using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Mol. and Biochem. Parasitol. 31; pp. 107-116.
- GIRARDI, T.; ZASSINIVICH, G.; MESTRONI. 1974. Antitumour action of planar, organometallic Rhodium(I) complexes. Chem. Biol. Interactions, 9 p. 389.
- GIRARDI, T.; SAVA, G.; BERTOLI, G.; MESTRONI, G.; ZASSINOVICH, G. 1977. Antitumour action of two rhodium and ruthenium complexes in comparison with cis-dichlorodiamino platinum (II). Cancer Res. 37, p. 2662.
- GLAZ, E. T.; SZOLGAY, E.; STAGER, I.; TALAS, M. 1973. Antiviral Activity and Induction of Interferon-like Substances by Quinacrine and Acranil. Antimicrob. Agents Chemother. 3; p. 157.
- GLEW, R. H.; CZUCZMAN, M.; DIVEN, W. F.; BERENS, R. L.; POPE, M. T.; KATSOULIS, D. E. 1982. Citado por MARR, J. J. en Leishmaniasis (Chang/Bray, eds.) 1985.
- GLEW, R. H., SAHA, A. K., DAS, S. AND REMALEY, A. T. (1988). Biochemistry of the *Leishmania* species. Microbiol. Rev. 52; pp. 412-432.
- GOAD, L. J.; HOLTZ, G. G.; BEACH, D. H. 1985. Sterols of ketoconazole-inhibited *L. mexicana mexicana* promastigotes. Mol. Biochem. Parasitol., 15 (3); pp. 257-79.
- GOBLE, F. C.; 1961. Tratamiento de la enfermedad de Chagas. Bol. Of. Sanit. Panamer., 51 pp. 439-449.
- GOLDENBERG, S.; CONGRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; BONALDO, M. C.; LIMA FRANCO, M.P.A. DE; LINSS, J.; LAFAILLE, J.; VALLE, D.; MOREL, C. M. 1984. Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 79 (Suppl.); pp. 39-44.
- GONÇALVES, A. M.; VASCONCELLOS, M. E.; DOCAMPO, R.; CRUZ, F. S.; DE SOUZA, W.; LEON, W. 1980. Evaluation of the toxicity of 3-allyl-B-lapachone against *T. cruzi* bloods tream forms. Mol. Biochem. Parasitol. 1 pp. 167-176.
- GONZALEZ, A. 1991. Tesis Doctoral. Citado por CASTILLA-CALVENTE, J. J.; SANCHEZ-MORENO, M.; MESA-VALLE, C.; OSUNA, A. 1994. The "in vitro" culture of *L. donovani* and [<sup>1</sup>H]NMR characterization of its amastigote-like forms. Mol. Cell. Biochem. Aceptado para publicación, Febrero de 1994.
- GOTTLIEB, M. DWYER, D. M. 1983. Evidence for distinct 5'-3'-nucleotidase activities in the surface membrane fraction of *Leishmania donovani* promastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 7, pp. 303-317.
- GRADY, R. W.; BLOBSTEIN, S. H.; MESHNICK, S. R.; ULRICH, C. P.; CERAMI, A.; AMIRMOAZZAMI, J.; HODNETT, E. M. 1984. The "in vitro" trypanocida activity of n-substituted p-benzoquinone imines: Assessment of biochemical structure activity relationship using the Hansch approach. J. Cel. Biochem., 25, pp. 15-29.

## BIBLIOGRAFIA

---

- GRAHAME, R.; SIMMONDS, H. A.; CAMERON, J. S.; CADENHEAD, A. 1977. Thiopurinol: Dose-related effect on urinary oxypurine excretion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 76B p. 312.
- GRAHAME, R.; SIMMONS, H. A.; CADENHEAD, A.; BEAN, B. M. 1974. Metabolic studies of thiopurinol in man and pig. *Adv. Exp. Med. Biol.* 41, p. 597.
- GRANT, P. T., SARGENT, J. R. 1960. Properties of L-alfa-glycerophosphate oxidase and its role in the respiration of *Trypanosoma rhodesiense*. *Biochem. J* 76; pp. 229-237.
- GREENBLATT, C. L.; MELINE, D.; SLUTZKY, M.; SCHNUR, L. F. 1984. Surface reaction of *Leishmania*. III Ulex europeaeus II lectin affinity for excreted factor (EF) serotype A strains. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78, pp. 99-107.
- GREGORIADIS, G. 1977. Targeting of drugs. *Nature*, 265 pp. 407-411.
- GRIFFITH, O. W.; MEISTER, A. 1979. *J. Biol. Chem.* 254, p. 7558. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanotone Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.
- GRISOOLD, D. P.; CASEY, A. E.; WEISBURGER, E. K.; WEISBRUG, J. H. 1968. The Carcinogenicity of Multiple Intragastric Dose of Aromatic and Heterocyclic Nitro- or Amino-derivatives in Young Female Sprague-Dawley Rats. *Cancer Res.* 28, p. 924.
- GROWTHER, D.; MELNICK, J. L. 1961. The incorporation of Neutral Red and Acridine Orange into Developing Poliovirus Particles Making them Photosensitive. *Virology*, 14, p. 2.
- GRUENBERG, J., SHARMA, P. J., DESHUSSES, J. 1978. D-Glucose transport in *Trypanosoma brucei*: D-Glucose transport is the rate limiting step of its metabolism. *Eur. J. Biochem.* 89: 461-469.
- GRUENBERG, J., SCHWENDIMANN, B., SHARMA, P.R., DESHUSSES, J. 1980. Role of glycerol permeation in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J. Protozool.* 27; pp. 484-491.
- GUGLIOTA, J. L.; TANOWITZ, H. B.; WITTNER, M.; SOEIRO, R.; 1980. *T. cruzi*: inhibition of protein synthesis by Nitrofurantoin SQ 18.506. *Exp. Parasitol.*; 49 (2) pp. 216-224.
- GUTTERIDGE, W. E., DAVIES, M. J. 1982. *FEMS Microbiol Lett.* 13: 207-212. Citado por: CASTILLA CALVENTE, J. J.; MESA VALLE, C.; RODRIGUEZ, N.; ARNEDO, T.; BARBE, J.; OSUNA, A. 1993. "In vitro" action of three acridine derivatives against epimastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, including a [<sup>1</sup>H] NMR study of alterations in the metabolite production. *Abs. B. IX Internat. Cong. Prot. Berlin*.
- GUTTERIDGE, W. E.; GABORAK, M.; COVER, B.; 1978. Comparative study of SQ 18.506 with other nitroheterocyclic compounds on experimental Chagas disease. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 72 (4) pp. 339-347.
- GUTTERIDGE, W. E. 1976. Isolation of blood and intracellular forms of *T. cruzi* and comparative aspects of nucleic acid metabolism. In: Van den Bossche, H. (ed.) *Biochemistry of parasites and host parasites relationship*. Amsterdam, Elsevier/North. Holland Biomedical Press. pp. 245-252.

- GUTTERIDGE, W. E.; GABORAK, M. 1977. Preliminary studies of purine and pyrimidine metabolism in *T. cruzi*. Parasitol., 75.
- GUTTERIDGE, W. E.; ROGERSON, G. W. 1979. Biochemical aspects of the biology of *Trypanosoma cruzi*. In: Biology of the Kinetoplastida, (Lumsden, W. H. R. and Evans, D. A.) Vol. 2, pp. 619-652, Academic Press, New York.
- GUTTERIDGE, W. E.; ROBERSON, G. N. 1978. Biochemical aspects of the biology of *T. cruzi*. In: Lumsden, W. H. and D. A. Evans (ed.). Biology of the kinetoplastida Vol. 2. N. Y., Academic Press. pp. 254-58.
- HABERKORN, A. y GOENNERT, R.; 1977. Animal experimental investigation on the action of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. *Arz. Forschung.*; 22, pp, 1570-1582.
- HABERKORN, A.; 1979. The effect of Nifurtimox on experimental infections with Trypanosomatidae other than *Trypanosoma cruzi*. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Org. A.*; 244 pp. 331-338.
- HADDOW, A.; ROBINSON, A. 1937. Influence of Various Polycyclic Hydrocarbons on the Growth Rate of Transplantable Tumors. *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* 122, 442.
- HAJRA, A.K. 1982. *Ann.NY Acad.Sci.* 386: 170-182. Citado por: CASTILLA CALVENTE, J. J.; MESA VALLE, C.; RODRIGUEZ, N.; ARNEDO, T.; BARBE, J.; OSUNA, A. 1993. "In vitro" action of three acridine derivatives against epimastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, including a [<sup>1</sup>H] NMR study of alterations in the metabolite production. *Abs. B. IX Internat. Cong. Prot. Berlin.*
- HAMMOND, D. J.; GUTTERIDGE, W.E. 1982. *Biochim. Biophys. Acta* 718:1-10. Citado por: CASTILLA CALVENTE, J. J.; MESA VALLE, C.; RODRIGUEZ, N.; ARNEDO, T.; BARBE, J.; OSUNA, A. 1993. "In vitro" action of three acridine derivatives against epimastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, including a [<sup>1</sup>H] NMR study of alterations in the metabolite production. *Abs. B. IX Internat. Cong. Prot. Berlin.*
- HAMMOND, D. J.; COVER, B.; GUTTERIDGE, W. E. 1984. A novel series of chemical structures actives in vitro against the trypomastigote form of *T. cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, pp. 91-95.
- HAMMOND, D.J.; AMAN, R.A. , WANG, C.C. 1985. *J. Biol. Chem.* 2; pp. 5646-5654. Citado por: CASTILLA CALVENTE, J. J.; MESA VALLE, C.; RODRIGUEZ, N.; ARNEDO, T.; BARBE, J.; OSUNA, A. 1993. "In vitro" action of three acridine derivatives against epimastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, including a [<sup>1</sup>H] NMR study of alterations in the metabolite production. *Abs. B. IX Internat. Cong. Prot. Berlin.*
- HAMMOND, D. J.; BOWMAN, I. B. R. 1980a. The effect of glycerol on the anaerobic metabolism of glucose. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2; pp. 63-75.
- HAMMOND, D. J.; GUTTERIDGE, W. E.; OPPERDOES, F. R. 1981. A novel location of two enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis in trypanosomes and *Leishmania*. *FEBS Lett.* 128, pp. 27-29.

## BIBLIOGRAFIA

---

- HAMMOND, D. J. ; GUTTERIDGE, W.E. 1980. FEBS Lett. 118: 259-262. Citado por: HAMMOND, D. J. , BOWMAN, I. B. R. 1980a. The effect of glycerol on the anaerobic metabolism of glucose. Mol. Biochem. Parasitol. 2; pp. 63-75.
- HAMMOND, D. J. , GUTTERIDGE, W. E. , OPPERDOES, F. R. 1981. A novel location for two enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis in trypanosomes and *Leishmania*. FEBS Lett. 128:27-29.
- HAMMOND, D. J. , BOWMAN, I. B. R. 1980b. Studies on glycerol kinase and its role in ATP synthesis in *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol. 2:77-91.
- HANDMAN, E.; SPIRA, D. T. 1977. Growth of *Leishmania* amastigotes in macrophages from normal and immune mice. Zeitsch. fur Parasito., 53, pp. 75-81. Citado por Escario y Gómez, 1992. En: Avances en Parasitología. Universidad de Santiago de Compostela Eds.
- HANNAERT , V . , CORNELIS, C . , MEYER , J . M. MICHELS , P. 1988 . Arch. Int. Physiol. Biochim. 97 C2 1 B35. Citado por: SANCHEZ-MORENO; MONESTIER, A; BECERRA, C. F.; LOPEZ-GAY, J.; OPPERDOES, F. R.; OSUNA, A. 1993. In vitro culture of *Phytomonas sp.*; isolated from *Euphorbia characias*. Metabolic studies by <sup>1</sup>H-NMR. J. Protozool. En prensa.
- HANNAERT, V., BLAAUW, M., KOHL, L., ALLERT, S., OPPERDOES, F.R., 1992. Mol. Biochem. Parasitol. 55(1-2); pp. 115-126.
- HANSON, W. L.; CHAPMAN, W. L. Jr.; KINNAMON, K. E. 1977. Testing of drugs for antileishmanial activity in golden hamsters infected with *L. donovani*. Int. J. Parasitol., 7, pp. 443-7.
- HART, D. T. , OPPERDOES, F. R. 1984. The occurrence of glycosomes (microbodies) in the promastigote stage of four major *Leishmania* species. Mol . Biochem. Parasitol. 13: 159-172.
- HART, D. T.; OPPERDOES, F. R. 1984. The occurrence of glycosomes (microbodies) in the promastigote stage of four major *Leishmania* species. Mol. Biochem. Parasitol., 13: pp. 159-172.
- HART, D. T.; GHAFOR, M. Y.; CRAFT, J. A.; COOMBS, G. H. 1980. Subcellular fractionation of *Leishmania mexicana mexicana* promastigotes. J. Parasitol. 81, ix.
- HART, D. T.; OPPERDOES, F. R. 1983. The glycosomes of *Leishmania*. J. Protozoology 30, 37A.
- HART , D . T . , BAUDHUIN , P . , OPPERDOES , F R . de DUVE, C. 1987. EMBO J. 6C 51, pp. 1403-1411. Citado por MICHELS, P. A. M.; OPPERDOES, F. R. 1991. The Evolutionary Origin of Glycosomes. Parasitol. Today. Vol. 7; 5; pp. 105-109.
- HART, D. T. , LAUWERS, W. J. , VILLEMSSENS, G. , VAN DEN BOSSCHE, H. OPPERDOES, F. R. 1989. Mol . Biochem. Parasitol . 33: 123-134. Citado por MESA-VALLE, C. 1991. Tesis Doctoral. Quimioterapia experimental frente a la leishmaniosis visceral. Universidad de Granada. Granada. España.
- HART, D. T.; VICKERMAN, K.; COOMBS, G. H. 1981. Parasitol., 82, pp. 345-55. Citado por MESA-VALLE, C. 1991. Tesis Doctoral. Quimioterapia experimental frente a la leishmaniosis visceral. Universidad de Granada. Granada. España.

- HART, D. T., AND COOMBS, G. H. (1982). *Leishmania mexicana*: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Exp. Parasitol.* 54, 397-409.
- HART, D. T. , MISSET, O. , EDWARDS, S. , OPPERDOES, F R. 1984. A comparison of the glycosomes (microbodies) isolated from *Trypanosoma brucei* bloodstream form and cultured procyclic trypomastigotes. *Mol.Biochem. Parasitol.* 12:25-35.
- HAY, R.; MACY, M.; CHEN, T. R. 1988. McClintock and Reid, Y. Eds. American Type Culture Collection. Catalogue of cell lines and hybridomas. (6 Ed.) Rockville. Maryland (USA).
- HAZARIKA, A. N. 1949. Treatment of kala-azar with pentamidine isothionate: a study of 55 cases. *Ind. Med. Gaz.*, 84 pp. 140-5.
- HENDERSON, J. F.; PATERSON, A. R. P. 1973. En: *Nucleotide Metabolism*, p. 116, Academic Press, N.Y.
- HENDERSON, G. B.; FAIRLAMB, A. H.; ULRICH, P.; CERAMI, A. 1987. *Biochem.* 26, p. 3023. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanotione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.
- HERNANDEZ, 1983. In: *Cytopathology of Parasitic Diseases*. Ciba Found. Symp. 99, pp. 138-56.
- HILL, G. C. 1971. Purification and properties of cytochromes c from trypanosomatids. *Biochem. Biophys. Acta.* 143, pp. 225-229.
- HO CHUEN HUEI; CLARK, B. R.; GUERIN, R. BARBENBUS, B. 1981. Studies of Chemical Structure-Mutagenic Activity Relationships of Aromatic Nitrogen Compounds Relevant to Synfuels. *Mutation Res.* 85, 335.
- HOARE, C. A. , ed. 1972. *The Trypanosomes of Mammals*. Zoological Monograph. Oxford:Blackwell.
- HOMSY, J. J.; GRANGER, B.; KRASSNER, S. M. 1989. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* 36, 150-153.
- HUDSON, L.; HAY, F. C. 1989. *Practical Immunology*. Blackwell Scientific Publications (ed.) Oxford.
- HUNTER, K.J.; STROBOS, C. A. M.; FAIRLAMB, A. H. 1990. *Biochem. Soc. Trans.* 18; p. 1094. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanotione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.
- I.A.R.C. Monographs. 1978. The evaluation of the carcinogenesis risk of chemical in man. Vol. 16, pp. 148-52.
- IBOLL, J. 1939. The Relative Potency of Carcinogenic Compounds. *Amer. J. Cancer*, 35, p. 188.
- INFORME DE LA ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD SOBRE LEISHMANIASIS; 1989.



BIBLIOGRAFIA

---

- IOVANNISCI, D. M.; KAUR, K.; YOUNG, L.; ULLMAN, B. 1984. Genetic analysis of nucleoside transport in *L. donovani*. *Mol. Cell. Biol.* 4, pp. 1013-9.
- ISOLA, E. L. D.; LAMMEL, E. M.; REDRUELLO, M. 1989. *Trypanosoma cruzi*: conditions required to improve metacyclic differentiation in axenic culture. *Rev. Argent. Microbiol.* 21, 9-14.
- JADIN, J. M.; TROUET, A.; VAN HOOF, F.; BIOUL-MARCHAND, M.; MALDAGUE, P.; JADIN-NYSSENS, M. 1977,b. Etude comparative d'une chimiotherapie lisosomotrope dans la maladie de Chagas et dans le Nagana. *Ann. Soc. Bel. Med. Trop.*, 57 (4-5); pp. 525-530.
- JADIN, J. M.; TROUET, A.; JADIN-NYSSENS, M.; DELVAUX, M.; VANHOOF, F. 1977,a. New attempts at chemotherapy in South American trypanosomiasis. 5 th Int. Congr. Protozool., New York, p. 393.
- JENNINGS, F. W. 1989. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Fialiales.* 81, p. 595. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanotione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism.* 1991. C.C. Wang ed. USA.
- JENNINGS, F. W. 1988. *Trans. Roy. Trop. Med. and Hyg.* 82, p. 572. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanotione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism.* 1991. C.C. Wang ed. USA.
- JHA, T. K.; SHARMA, V. K. 1984. Pentamidine-induced diabetes mellitus. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78 (2) pp. 252-3.
- JHA, T. K. 1983. Evaluation of diamidine compound (pentamidine isetionate) in the treatment of resistant cases of kala-azar occurin in North Bihar, India. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77, pp. 167-70.
- JOHNSON, J. L.; WERBEL, L. M. 1983. Synthesis and antileishmanial activity of 6-methoxy-4-methyl-N-[6-(substituted-1-piperazinyl)hexyl]-8-quinolinamines and related compounds. *J. Med. Chem.*, 26, (2) pp. 185-94.
- JONES y col. 1971. *Obstet. Gynecol.*, 38, pp. 945-949. Citado por: HAY, R.; MACY, M.; CHEN, T. R. 1988. McClintock and Reid, Y. Eds. *American Type Culture Collection. Cataloge of cell lines and hybridomas.* (6 Ed.) Rockville. Maryland (USA).
- KANAN, M. W. 1975. The fine structure of *Leishmania enriettii* in the Guinea pigs. *International J. Parasitol.*, 5, pp. 651-7.
- KAR, K., MUKERJI, K., NASKAR, K., BHATTACHARYA, A. AND GHOSH, D. K. 1990. *Leishmania donovani*: A Chemically Defined Medium Suitable for Cultivation and Cloning of Promastigotes and Transformation of Amastigotes to Promastigotes. *J. Protoz.* 37 (4), pp. 277-279.
- KATO, H. 1974. Induction of Sister Chromatid Exchanges by Chemical Mutagens and its Possible Relevance to DNA Repair. *Exp. Cell Res.* 85, p. 239.

- KAUR, K.; EMMETT, K.; MCCANN, P. P.; SJOERDSMA, A.; ULLMAN, B. J. 1986. Protozool. 33, p. 518. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanotione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: Molecular and Immunological Aspects of Parasitism. 1991. C.C. Wang ed. USA.
- KEEGAN, F. AND BLUM, J.J. 1990. Effects of oxygen concentration on the intermediary metabolism of *Leishmania major* promastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 39; pp. 234-246.
- KEITHLY, J. S.; FAIRLAMB, A. H. 1989. Inhibition of *Leishmania spp.* by alphasulfamethoxymethylornithine, in Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control, D. T. Hart, Ed. (Plenum Press/NATO ASI Series, vol. 163, N.Y.) pp. 749-756.
- KELLER, G.A.; KRISANS, S.; GOULD, S.,L.; SOMMER, J.M.; WANG,C.,C.; KENNEDY, J. S.; ANDERSON, J. D. 1983. The effect of treatment of the associated disease on the development of amyloidosis in the experimental animal. J. Parasitol.. 14 (1) pp. 11-15.
- KHALID, S. A.; FAROUK, A.; GEARY, T. G.; JENSEN, J. B. 1986. J.Ethno. Pharmacol., 151, p. 201. Citado por :BERNY, H.; BSIRI, N.; CHARBIT, J. J.; GALY, A. M.; SOYFER, J. C.; GALY, J. P.; BARBE, J.; SHARPLES, D.; MESA-VALLE, C.; MASCARO, C.; OSUNA, A. 1992. 1,4-Dimetoxo-9(10H)-acridinone Derivatives. Drug. Res. 42 (1), 5, pp. 674-679-
- KIDDER, G. W. y NOLAN, L. L.; 1981. The "in vivo" and "in vitro" action of 4-amino-5-imidazol carboxamide in trypanosomatid flagellates. Mcl. Biochem. Parasitol., 3 pp. 265-269.
- KIERSZENBAUN. F.; WIRTH, J. J.; MCCANN, P. P.; SJOERDSMA, A. 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, p. 4278.
- KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. 1974. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. Proc. R. Soc. London, ser. B, 187; pp. 409-19.
- KILLICK-KENDRICK, R. 1979. Biology of *Leishmania* in Phlebotomine sandflies. In: Biology of the kinetoplastida. (W. H. R. Lumsden and D. A. Evans, Eds.). Academic Press Inc.: London, New York, 2. pp. 395-460.
- KILLICK-KENDRICK, R.; LEANEY, A. I.; READY, T. D.; MOLYNEUX, D. H. 1977. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. Proc. Roy. Soc., London, B, 196, pp. 105-15.
- KINNAMON, K. E.; STECK, E. A.; LUIZEAU, P. S.; HANSEN, W. L.; CHAPMAN, W. L. Jr. ; WAITS, V. B. 1978. The antileishmanial activity of lepidines. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 27 (4), pp. 751-7.
- KINNAMON, K. E.; STECK, E. A.; RANE, S. D. 1979. Activity of antitumour drugs against African trypanosomes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 15, pp. 157-60.
- KMETEC, E. 1966. Spectrophotometric method for the enzymatic microdetermination of succinic acid. Analyt. Biochem. 16, pp. 474-480.

BIBLIOGRAFIA

- KOHNO, T.; ROTH, J. R. 1974. Proflavine Mutagenesis of Bacteria. *J. Mol. Biol.* 89, 17.
- KOLDEJ, K. 1977. On the interaction of ledakrin with deoxyribonucleic acid. Ph. D. Dissertation-Technical University-Gdansk-Poland.
- KOU, J. F.; RAYNOR, R. L.; MAZZEI, G. P. 1983. *FEBS Lett.* 153, pp. 183-6. Citado por ZOLLNER, M. 1993, *Handbook of Enzyme Inhibitors*. V.C.H. ed. N.Y. USA.
- KRAMMER, M. J.; CLEELAND, R.; GRUNBERG, E. 1976. Antiviral Activity of 10-carboxymethyl-9-acridanone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9, p. 233.
- KRANTH-SIEGEL, R. L.; ENDERS, B.; HENDERSON, G. B.; FAIRLAMB, A. H.; SCHIRMER, R. H. 1987. *Eur. J. biochem.* 164, p. 123. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanotione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.
- KRASSNER, S. M.; FLORY, B. 1972. Proline Metabolism in *L. donovani* promastigotes. *J. Protozool.*, 19, pp. 682-5.
- KRASSNER, S. M.; GRANGER, B.; PHERMSANGNGNAM, P.; LE, T.; LINDEN, V. 1990. Further studies on substrates inducing metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* 37, 128-132.
- KRETNITSKY, T. A.; KUSZALKA, G. W.; TUTTLE, J. V.; ADAMCZYK, D. L.; ELION, G. B.; MARR, J. J. 1980. Purine salvage enzymes in man and *L. donovani*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 122 pp. 51-6.
- KRISANS, S. K.; MORTENSEN, R. M.; LAZAROW, P. B. 1980. Acyl-CoA synthetase in rat liver peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 255, pp. 9599-9607.
- KUBBA, R.; AL-GINDAN, Y.; EL-HASSAN, A. M.; EL-HAMID, A.; OMER, S. 1986. Ketoconazole in cutaneous leishmaniasis: results of a pilot study. *Saudi Med. J.*, 7 (6), pp. 596-604.
- LAMBEIR, A. M., LOISEU, A. M., KUNTZ, D.A., VELLIEUX, F., M., MICHELS, P.A.M., OPPERDOES, F.R. 1991. *Eur. J. Biochem.* 198 (2); pp. 429-435. Citado por: CASTILLA CALVENTE, J. J.; MESA VALLE, C.; RODRIGUEZ, N.; ARNEDO, T.; BARBE, J.; OSUNA, A. 1993. "In vitro" action of three acridine derivatives against epimastigote and amastigote forms of *T. cruzi*, including a [<sup>1</sup>H] NMR study of alterations in the metabolite production. Abs. B. IX Internat. Cong. Prot. Berlin.
- LAMBEIR, A. M.; OPPERDOES, F. R.; WIERENGA, R. K. 1987. Kinetic properties of triose-phosphate isomerase from *T. brucei brucei*. *Eur. J. Biochem.* 168, pp. 69-74.
- LAUNOY, L.; GUILLOT, M.; JOUCHERE, H. 1960. Etude du stockage et l'elimination de la pentamidine chez la souris et le rat blanc. *Annales Pharmaceutique Francaises.* 18 pp. 223-84.
- LAVERAN, A.; MESNIL, F. 1903. Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. et Mesn.) Parasite d'une fièvre de L'Inde *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L'Academie des Sciences.* 137, pp. 957-61.

- LEDINKO, K.O. 1958. Production of Non-infectious Complement Fixing Poliovirus Particles in HeLa Cells Treated with Proflavine. *Virology*, 6, p. 512.
- LEDOCHOWSKI, Z. 1971. Studies on Structure-Activity Relationship in the Anti-tumor Properties of Acridines Derivatives. *Advan. Antimicrob. Antineoplastic Chemother., Proc. Int. Congr. Chemother.* 7 th, 2, p.133.
- LEDOCHOWSKI, Z. 1962. Research on Tumor Inhibiting Compounds. X-Synthesis of N-(3-chloro-7-methoxy-9-acridyl)glycine and its ethyl ester and amide. *Acta UICC*, 18, p. 222.
- LEISHMAN, W. B. 1903. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *British Med. J.* 1, pp. 1252-54.
- LEON, L.; VASCONCELLOS, M. E.; LEON, W.; CRUZ, F. S.; DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; 1978. *T. cruzi*: effect of olivacine on macromolecular syntesis, ultrastructure, and respiration of epimastigotes. *Exp. Parasitol.*, 45 pp. 151-159.
- LEON, W.; FRASCH, A.; HOEIJMAKERS, J. A. J.; FASE-FOWLER, F.; BORST, P.; DAVISON, J. 1980. Maxi-circles and mini-circles in kinetoplast DNA from *T. cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta.* 607, pp. 221-31.
- LERMAN, L. S.; ALTMAN, S. 1967. Alterations of T4 DNA Synthesis with Presence of 9-Aminoacridine. *Mol. Ass. Biol. Proc. Int. Symp. (Pub. 1968)*, pp. 272. Ed. Pullman, Bernard. Acad. Press, New-York.
- LERMAN, L. S. 1963. The structure of the DNA-Acridine Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, 49, p. 94.
- LERMAN, L. S. 1961. Structural consideration in the interactions of DNA and Acridines. *J. Mol. Biol.* 3, p. 18.
- LERMAN, L. S. 1964. Amino-group Reactivity in DNA-acridine Complexes. *J. Mol. Biol.* 10, p. 367.
- LERMAN, L. S. 1964. Acridines Mutagens and DNA Structure. *J. Cell. Comp. Physiol.* 64, Supp. I, p. 18.
- LEWIS, M. R.; GOLAND, F. P. 1948. "In vivo" staining and retardation of tumor in mice by acridine compounds. *Amer. J. Med. Sci.* 215, p. 282.
- LICHEY, J.; LINDERER, Th.; YISSMAN, Th. 1979. Ein Erkrankungsfall an viszeraler Leishmaniose (kala-azar): Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Pentamidine. *Munchener Medizinische Wochenschrift.* 121, pp. 665-6.
- LOOKER, D. L.; BERENS, R. L.; MARR, J. J. 1983. A mechanism for the antileishmanial action of pyrazolopyrimidines. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 9, pp. 15-28.

BIBLIOGRAFIA

---

- LOPES, J. N.; CRUZ, F. S.; DOCAMPO, R.; VASCONCELLOS, M. E.; SAMPAIO, M. L. R.; PINTO, A. U.; GILBERT, B. 1978. "In vitro" and "in vivo" evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2 naphthoquinone derivatives against *T. cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 72 (6) pp. 523-531.
- LOPEZ, M. C.; RUIZ-PEREZ, L. M.; CRACIUNESCU, D.; DOADRIO, A.; OSUNA, A.; ALONSO, C. 1985. Studies on the interaction between cis-DDP analogs with DNA. *Biochem. Biophys. Acta*.
- MACDONALD, P.L.; ROBERTSON, A. V. 1966. *Aust. J. Chem.* 19, p. 275. Citado por: LOPEZ, M. C.; RUIZ-PEREZ, L. M.; CRACIUNESCU, D.; DOADRIO, A.; OSUNA, A.; ALONSO, C. 1985. Studies on the interaction between cis-DDP analogs with DNA. *Biochem. Biophys. Acta*.
- MACKENZIE, N. E.; HALL, J. E.; SEED, J. R.; SCOTT, A. I. 1982. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of glucose catabolism by *Trypanosoma brucei gambiense*. *Eur. J. Biochem.* 121; pp. 657-661.
- MACKENZIE, N. E.; HALL, J. E.; FLYNN, I. W.; SCOTT, A. I. 1983. <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of anaerobic glycolysis in *Trypanosoma brucei* spp. *Biosci. Rep.* 3; pp. 141-151.
- MACQUET, J. P.; BOTOOR, J. L. 1978. Modifications of the DNA secondary structure upon platinum binding: a proposed model *Biochimie.* 60, pp. 901-14.
- MAEGRAITH, B. G.; BRUNDRETT, J. C.; RIGBY, J. D.; SLADDEN, R. A. 1947. Sodium Stibogluconate in the treatment of kala-azar: report on the treatment of eight cases and the appearance of probable drug reactions. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 41 pp. 118-128.
- MAGNI, G. E.; VON BORSTER, R. C.; SORA, S. 1964. Mutagenic Action during Meiosis and Antimutagenic Action during Mitosis by 5-Aminoacridine in Yeast. *Mutation Res.* I, p. 227.
- MANCILLA, R.; NAQUIRA, C. 1964. Comparative metabolism of <sup>14</sup>C-glucose in two strains of *T. cruzi*. *J. Protozool.*, 11, pp. 509-13.
- MANSON-BAHR, P. E. C.; HEISCH, R. B. 1956. Studies in leishmaniasis in East Africa. III. Clinical features and treatment. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 50, pp. 465-71.
- MARCHAND, F.; LEDINGHAN, J. C. G. 1904. On the question of trypanosoma infection in man. *Lancet*, 166, pp. 145-50.
- MARR, J. J.; BERENS, R. L.; NELSON, D. J.; 1978. Antitrypanosomal effect of Allopurinol: Conversion "in vivo" to aminopyrazolopyrimidine nucleotides by *T. cruzi*. *Science*, 201; pp. 1018-1020.
- MARR, J. J.; BERENS, R. L.; NELSON, D. I. 1978. Purine metabolism in *L. donovani* and *L. braziliensis*. *Biochem. Biophys. Acta*, 544; 360-71.
- MARR, J. J.; BERENS, R. L.; NELSON, D. J.; KRENITSKY, T. A.; SPECTOR, T.; LAFON, S. W.; ELION, G. B. 1981. Antileishmanial action of 4-thiopyrazolo (3,4-d)pyrimidine and its ribonucleoside: biological effects and metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 31, pp. 143-8.

- MARR, J. J.; BERENS, R. L. 1977. Antileishmanial effect of allopurinol. II. Relationship of adenine metabolism in *Leishmania* species to the action of allopurinol. *J. Infect. Diseases*. 136, pp. 724-31.
- MARTIN-SANZ, P.; CASCALES, M.; CRACIUNESCU, D.; CASCALES, M. 1983. Effect Rh complexes on experimental carcinogenesis. Fourth International Symposium on Pt Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy.
- MATTOCK, N. M.; PETERS, W. 1975,b. The experimental chemotherapy of leishmaniasis. I: Techniques for the study of drug action on tissue culture. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 69, pp. 349-357.
- MATTOCK, N. M.; PETERS, W. 1975,a. The experimental chemotherapy of leishmaniasis. II. The activity in tissue culture of some antiparasitic and antimicrobial compounds in clinical use. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 69; pp.359-71.
- MAYOR, H. D.; DIWAN, A. R. 1961. Studies on the Acridine Orange Staining of two Purified RNA Viruses: Poliovirus and Tobacco Mosaic Virus. *Virology*, 14, p. 74.
- Mc CLARY, D. C.; BOWERS, W. D. 1968. Mitochondrial Changes Accompanying Acriflavine-Induced "Petite Mutation" in *Saccharomyces fragilis*. *J. Ultrastructural. Res.* 25; p.37.
- MCCANN, P. P.; BACCHI, C. J.; NATHAN, H. C.; SJOERDSMA, A. 1983. Difluoromethylornithine and the rational development of polyamine antagonists for the cure of protozoan infection, in *Mechanisms of Drug Action*, T. P. Singer and R. N. Ondraza, Eds. (Academic Press, N. Y., 1983) pp. 159-173.
- McDONALD, P.; ROBERTSON, T. 1966. Citado por :BERNY, H.; BSIRI, N.; CHARBIT, J. J.; GALY, A. M.; SOYFER, J. C.; GALY, J. P.; BARBE, J.; SHARPLES, D.; MESA-VALLE, C.; MASCARO, C.; OSUNA, A. 1992. 1,4-Dimetoxy-9(10H)-acridinone Derivatives. *Drug. Res.* 42 (I), 5, pp. 674-679-
- McGHEE, M. B. , COSGROVE, W. B. 1980. Biology and physiology of the lower *Trypanosomatidae*, *Microbiol Rev.* 44: 140-153.
- McLAUGHLIN, J. 1981. Citado por: McLAUGHLIN, J. 1985. *Mol.Biochem.Parasitol.*14: 219-230. Association of adenylate kinase with the glycosome of *Trypanosoma rhodesiense*. *Biochem. Int.* 2: 345-353.
- McLAUGHLIN, J. 1985. *Mol.Biochem.Parasitol.*14: 219-230. Association of adenylate kinase with the glycosome of *Trypanosoma rhodesiense*. *Biochem. Int.* 2: 345-353.
- McNEELY, T. B.; TURCO, S. J. 1990. Lipophosphoglycan for intracellular survival of *L. donovani* within human monocytes. *J. Immunol.* 144, pp. 2745-50.
- MEDINA PEREZ, M. M. 1986. Tesis Doctoral. Los liposomas como sistemas transportadores de fármacos: estudio "in vitro" e "in vivo" del concepto de farmacotropismo aplicado al tratamiento de la leishmaniasis visceral experimental. Universidad de Granada. Granada. España.

## BIBLIOGRAFIA

---

- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. 1983. *Ann. Rev. Biochem.* 52; p. 711. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. *Trypanotione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis*. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.
- MEISTER, A. 1989. Metabolism and function of glutathione, in *Glutathione: Chemical Biochemical, and Medical Aspects*, D. Dolphin, R. Poulson, and O. Avramovic, Eds. (John Wiley and Sons, N.Y. 1989), pp. 367-474.
- MERCER, E. H.; BIRBECK, M. S. C. 1979. *Manual de Microscopía Electrónica Para Biólogos*. Blume Edit. Madrid. Spain.
- MESA-VALLE, C. M.; CRACIUNESCU, D.; PARRONDO-IGLESIAS, E.; OSUNA, A. 1989. "In vitro" action of Pt(II) and Pt(IV) complexes on *T. cruzi* and *L. donovani*. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 39 (II), pp. 838-42.
- MESA-VALLE, C. 1991. Tesis Doctoral. Quimioterapia experimental frente a la leishmaniosis visceral. Universidad de Granada. Granada. España.
- MESHNIC, K. S. R.; EATON, J. W. 1981. Leishmanial superoxide dismutase: a possible target for chemotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, pp. 970-6.
- MEYER, H.; DE SOUZA, W. 1976. Electron microscopic study of *T. cruzi* periplast in tissue cultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasites like cycle. *J. Protozool.*, 23, pp. 385-90.
- MICHAELIS, A.; RIEGER, R. 1963. Über den Einfluss von Acridinfarbstoffen auf die Induktion von Chromatiden Aberrationen durch Radiomimetica. *Kulturpflanze*, II, p. 403.
- MICHELS, P. A. M. 1989. Characterization of Trypanosomal Glycolytic Enzymes. *Proceedings of the Workshop on Chemotherapy of Trypanosomes*, Nairobi. pp. 1-10.
- MICHELS, P.A.M., MARCHAND, M., KOHL, L., ALLERT,S., WIERENGA, R.K., OPPERDOES,F.R. 1991. *EUR. J. BIOCHEM.* 198(2); pp. 421-428. Citado por: SANCHEZ-MORENO, M.; LASZTITY, D.; COPPENS, I.; OPPERDOES, F. R. 1992. Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas sp.* isolated from *Euphorbia characias*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54, pp. 185-200.
- MICHELS,P.A. , POLISZCAK, A. , OSINGA, K. , MISSET, O. VAN BEEUMEN,J. 1986. *EMBO J.* 5: 1049-1056. Citado por: OPPERDOES, F. R.; MICHELS, A. M. 1989. Evolutionary Origin of Peroxisomes. pp. 187-195. En: *Organelles in Eukaryotic Cells*. Tager y col. edit. Plenum Publishing Corporation, 1989. Italy.
- MILDER, R.; DEANE, M. P. 1969. The cytostome of *T. cruzi* and *T. conorhini*. *J. Protozool.*, 16, pp. 730-37.
- MILLER, P. G. G.; LINSTED, D. J.; KLEIN, R. A. 1976. Routes for the synthesis and utilization of acetil CoA in trypanosomatids flagellates. *Parasitol.*, 73: XVI.

- MISSET, O. , OPPERDOES, F. R. 1984. Simultaneous purification of phosphoglycerate kinase, fructose biphosphate aldolase, triosephosphate isomerase and hexokinase from *Trypanosoma brucei*. Eur. J. Biochem. 144; pp. 475-483.
- MISSET, O. , VAN BEEUMEN, J. , LAMBEIR, A. M. , VAN DER MEER, R. , OPPERDOES, F. R. 1987. Glyceraldehyde phosphate deshydrogenase from *T. brucei*: comparison of the glycosomal and cytosolic isoenzymes. Eur. J. Biochem. 162; pp. 501-509
- MISSET, O., BOS, O.J.M., OPPERDOES, F.R. 1986. Glycolytic enzymes of *T. brucei*. Simultaneous purification, intraglycosomal concentrations and physical properties. Eur. J. Biochem. 157; pp. 441-453.
- MISSET, O., OPPERDOES, F.R. 1989. Eur. J. Biochem. 162; pp. 493-500. Citado por: SANCHEZ-MORENO, M.; LASZTITY, D.; COPPENS, I.; OPPERDOES, F. R. 1992. Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas sp.* isolated from *Euphorbia characias*. Mol. Biochem. Parasitol. 54, pp. 185-200.
- MOLYNEUX, D. H. & KILLICK-KENDRICK, R. 1987. Morphology, ultrastructure and life cycles. Academic Press Inc. (London). Ltd. pp. 121-176.
- MOLYNEUX, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R.; ASHFORD, R. W. 1975. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. III. The ultrastructure of *Leishmania mexicana amazonensis* in the midgut and pharynx of *Lutzomyia longipalpis*. Proc. Roy. Soc., London B, 190, pp. 341-57.
- MOLYNEUX, D. H. , ASHFORD, R. W. 1983. The Biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, Parasites of Man and Domestic Animals. London: Taylor & Francis.
- MORENO, S. N. S.; DOCAMPO, R.; STOPPANI, A. O. M.; 1981. Mechanism of nifurtimox and benzimidazol toxicity in *T. cruzi* and the mammalian host. Pesquisas Basicas en Doença de Chagas. VIII Reuniao Annual, Caxambu, Brasil, p. 65.
- MORROW, C. D.; FLORY, B.; DRASSNER, S. M. 1980. Poliamines in the hemoglagellate, *L. donovani*: evidence for spermine in the amastigote stage. Biochem. Physiol. 66B, pp. 307-11.
- MORROW, D. T.; WESCOTT, R. B. y DAVIS, W. C.; 1977. Effect of length of treatment with Bayer 2502 on isolation of *Trypanosoma cruzi* and resistance to challenge in the mouse. Am. J. Trop. Med. Hyg.; 26 (3) pp. 382-386.
- MOTTRAM, J. C. , COOMBS, G. H. 1985. Biochim. Biophys. Acta 827; pp. 310-319. Citado por : MUKKADA, A. J. (1985). Energy metabolism in *Leishmania*. In: *Leishmaniasis* (Chang, K.- P and Bray, R.S., eds.), pp. 49-64, Elsevier, Amsterdam.
- MUKKADA, A. J. 1985. Energy metabolism in *Leishmania*. In: *Leishmaniasis*. (Chang/Bray, ed.), Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division) pp. 51-63. Amsterdam.
- MUKKADA, A.J. 1977. Act. Trop. 34; pp. 167-175. Citado por : MUKKADA, A. J. (1985). Energy metabolism in *Leishmania*. In: *Leishmaniasis* (Chang, K.- P and Bray, R.S., eds.), pp. 49-64, Elsevier, Amsterdam.



BIBLIOGRAFIA

- MUKKADA, A. J. (1985). Energy metabolism in Leishmania. In: Leishmaniasis (Chang, K.- P and Bray, R.S., eds.), pp. 49-64, Elsevier, Amsterdam.
- MULLER, W. E. G.; ROHDE, H. J.; STEFFEN, R. 1975. Influence of formycin B on polyadenosine diphosphoribose synthesis "in vitro" and "in vivo". *Cancer Research*, 35; pp. 167-75.
- MUNIS, J.; MEDINA, H. 1948. Leishmaniose tegumentar do cobaio Hospital Rio de Janeiro, 33, p. 3673.
- MURAKAMI, A. 1973. Mutagenesis of Acridine Orange in Mitotic Cleavage Nuclei of the Silkworm, Bombyx Mori. *Mutat. Res.* 20, p. 67.
- MURAKAMI, A. 1974. Mutagenic Activity of Quinacrine Hydrochloride in the Silkworm. *Mutat. Res.* 22, p. 295.
- MURPHEY, S. A.; JOSEPHS, A. S. 1981. Acute pancreatitis associated with pentamidine therapy. *Annals of International Medicine*, 141, pp. 56-8.
- MUSE, K. E. , ROBERTS, J. F. 1973. Microbodies in *Crithidia fasciculata*. *Protoplasma* 78: 343-348.
- NAGAI, S.; YANAGISHIMA, N.; NAGAI, H. 1961. Advances in the Study of Respiration Deficient (RD) Mutation in Yeast and Other Microorganisms. *Bact. Rev.* 25, p. 404.
- NASIM, A.; BRYCHLY, T. 1979. Genetic Effects of Acridine Compounds. *Mutat. Res.* 65, p. 261.
- NEAFS, B. 1985. Pentamidine-induced diabetes mellitus. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79 (1) p. 141.
- NEAL, R. A. 1968. The effect of antibiotics of the neomycin group in experimental cutaneous leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 62, pp. 54-62.
- NEAL, R. A. 1972. Effect of dihydrofolate reductase inhibitors on experimental cutaneous leishmaniasis with especial emphasis on *Leishmania* isolates from Latin-America. *Rev. Inst. Med. Trop.*, Sao Paulo, 14, pp. 341-51.
- NELSON, D. J.; LAFON, S. W.; TUTTLE, J. V.; MILLER, W. H.; MILLER, R. L.; KRENITSKY, T. A.; ELION, G. B. 1979. Allopurinol ribonucleoside as an antileishmanial agent: biological effects, metabolism and enzymatic phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 254, pp. 11544-9.
- NELSON, D. J.; LAFON, S. W.; ELION, G. B.; MARR, J. J.; BERENS, R. L. 1980. Comparative metabolism of a new antileishmanial agent, allopurinol riboside, in the parasite and host cell. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 122, B, pp. 7-12.
- NELSON, D. J.; LAFON, S. W.; JONES, T. E.; SPECTOR, T.; BERENS, R. L.; MARR, J. J. 1982. The metabolism of formycin B in *L. donovani*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108 (1) 349-54.
- NEW, R. R. C.; CHANCE, M. L.; THOMAS, S. C.; HEATH, S. 1981. Antileishmanial activity of amphotericina and other antifungal agents entrapped in liposomes. *J. Antimicrob. Chemot.*, 81, pp. 371-81.

- NEW, R. P. R.; CHANCEM, M. L.; THOMAS, S. C.; PETERS, W. 1978. Antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. *Nature*, London, 272, pp. 55-6.
- NEWTON, A.; MASYS, D., LEONARD, E.; MYGAI, D. 1974. Association of Induced Frameshift Mutagenesis and DNA Replication in *E. Coli*. *Nature New Biol.* 263, p. 19.
- NEWTON, B. A.; 1963. Trypanocidal Agents. En: *Metabolic inhibitors*. (R. M. Hochsger and J. M. Quaslet, eds.). Academic Press, N.Y., pp. 285-310.
- NOLAN, L. L.; BERMAN, J. D.; GIRI, L. 1984. The effect of formycin B on mRNA translation and uptake of purine precursors in *L. mexicana*. *Biochem. Internat.* 9, pp. 207-18.
- NUTI-RONCHY, V.; D'AMATO, F. 1961. New Data on Chromosome Breakage by Acridine Orange in the Allium Test. *Caryologia*, 4, p. 388.
- NWAGWU, M., OPPERDOES, F. R. 1981. *Act. Trop.* 39: 61-72. Citado por: OPPERDOES, F. R.; NOHYNKOVA, E.; VAN SCHAFTINGEN, E.; LAMBEIR, A. M.; VEENHUIS, M.; VAN ROY, J. 1988. Demonstration of glycosomes (microbodies) in the Bodonid flagellate *T. borrelli*. *Mol. Biochem. Parasitol.*; 30, pp. 155-164.
- ODURO, K. K., BOWMAN, I. B. R., FLYNN, I. W. 1980a. *Trypanosoma brucei*: Activities and subcellular distribution of glycolytic enzymes from differently disrupted cells. *Exp. Parasitol.* 50; pp. 240-250.
- ODURO, K. K., BOWMAN, I. B. R., FLYNN, I. W. 1980b. *Trypanosoma brucei*: Preparation and some properties of a multienzyme complex catalysing part of the glycolytic pathway. *Exp. Parasitol.* 50: 123-135.
- OPPERDOES, F.R., COTTEM, D. 1982. Involvement of the glycosome of *Trypanosoma brucei* in carbon dioxide fixation. *FEBS Lett.* 143; pp. 60-64.
- OPPERDOES, F. R., MICHELS, P. A. M., MISSET, O., HART, D. T., VAN BEEUMEN, J. 1987. *UCLA Symp. Mol. Cel. Biol.* NSI 42; pp. 543-552. Citado por: OPPERDOES, F. R.; NOHYNKOVA, E.; VAN SCHAFTINGEN, E.; LAMBEIR, A. M.; VEENHUIS, M.; VAN ROY, J. 1988. Demonstration of glycosomes (microbodies) in the Bodonid flagellate *T. borrelli*. *Mol. Biochem. Parasitol.*; 30, pp. 155-164.
- OPPERDOES, F. R., BORST, P., BAKKER, S. LEENE, W. 1977. Localization of glycerol-3-phosphate oxidase in the mitochondrion and particulate NAD<sup>+</sup>-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the microbodies of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* 76; pp. 29-39.
- OPPERDOES, F.R., BORST, P. 1977. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: The glicosome. *FEBS Lett.* 80; pp. 360-364.
- OPPERDOES, F.R., NWAGWU, M. 1980. In *the Host-Invader Interplay* ed. H. Van den Bossche. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomed.

## BIBLIOGRAFIA

---

- OPPERDOES, F.R. 1987. *Med. Trop*, 337: 113-117. Citado por Adroher F. J., 1989. Oxidación de la glucosa en *T. cruzi*. *Ars Pharm.* Tomo 30, nums. 3-4, pp. 245-256.
- OPPERDOES, F. R. , COTTEM, D. , LAMBEIR, A. M. MICHELS, P. 1988. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 97 C27 B50. Citado por OPFERDOES, F.R.; MICHELS, A. 1989. Biogenesis and Evolutionary Origin of Peroxisomes. En: *Organelles in Eukariotic Cells*. Ed. J.M Tager y col. Plenum Plubishing. Italia.
- OPPERDOES, F. R.; NOHYNKOVA, E.; VAN SCHAFTINGEN, E.; LAMBEIR, A. M.; VEENHUIS, M.; VAN ROY, J. 1988. Demonstration of glycosomes (microbodies) in the Bodonid flagellate *T. borrelli*. *Mol. Biochem. Parasitol.*; 30, pp. 155-164.
- OPPERDOES, F. R. , BAUDHUIN, P. , COPPENS, I. , DE ROE, C., EDWARDS, S.W., 1984. Purification, morphometric analysis and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.* 98: 1178-1184.
- OPPERDOES, F. R. , MARKOS, A. , STEIGER, R. F. 1981. Localization of malate dehydrogenase, adenylate kinase and glycolytic enzymes in glycosomes and the threonine pathway in the mitochondrion of cultured procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 4: 291-309.
- OPPERDOES, F.R. 1985. *Br. Med. Bull.* 41; pp. 130-136. Citado por OPFERDOES, F.R.; MICHELS, A. 1989. Biogenesis and Evolutionary Origin of Peroxisomes. En: *Organelles in Eukariotic Cells*. Ed. J.M Tager y col. Plenum Plubishing. Italia.
- OPPERDOES, F. R.; WIERENGA, R. K.; NOBLE, M. E. M.; HOL, W. G. J.; WILLSON, M.; KUNTZ, D. A.; CALLENS, M.; PERIE, J. 1990. Unique Properties of Glycosomal Enzymes. En: *Parasites: Molecular Biology, Drug and Vaccine Design*, pp. 233-246. Wiley-Liss, Inc.
- OPPERDOES, F.R. 1983a. In *Parasitology, A Global Perspective*, ed. K.S. Warren, J.Z. Bowers, pp. 191-202. New York: Springer-Verlag.
- OPPERDOES, F. R. 1983b. In *Mechanism of Prg Action*, ed. T. P. Singer, T.E. Mansour, R.N. Undarza, P. 121-132. New York: Academic.
- OPPERDOES, F. R.; MICHELS, A. M. 1989. Evolutionary Origin of Peroxisomes. pp. 187-195. En: *Organelles in Eukaryotic Cells*. Tager y col. edit. Plenum Publishing Corporation, 1989. Italy.
- OPPERDOES, F.R. 1987. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 127-151. Citado por MICHELS, P.A.M.; OPFERDOES, F.R. 1991. The Evolutionary Origin of Glycosomes. *Parasitol. Today*. Vol. 7; 5, pp. 105-109.
- OPPERDOES , F. R. , BORST , P. , FONK , K . 1976. The potential use of inhibitors of glycerol-3-phosphate oxidase for chemotherapy of African trypanosomiasis. *FEBS Lett.* 62 : 169-172.
- OPPERDOES, F. R. , MISSET, O. , HART, D. T. 1983. Johu Jacob Abel Symp. *Mol. Parasitol.* , pp. 63-75. Baltimore, Md: Academic. Citado por: OPFERDOES, F.R. 1984. Localization of the initial steps in alkoxyphospholipid biosynthesis in glycosomes (microbodies) of *Trypanosoma brucei*, *FEBS Lett.* 169: 35-39.

- OPPERDOES, F.R. 1984. Localization of the initial steps in alkoxyphospholipid biosynthesis in glycosomes (microbodies) of *Trypanosoma brucei*, FEBS Lett. 169: 35-39.
- OPPERDOES, F.R., 1990. Biochem Soc. Transc. 18(5): 729-731. Citado por: SANCHEZ-MORENO, M.; LASZTITY, D.; COPPENS, I.; OPPERDOES, F. R. 1992. Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. Mol. Biochem. Parasitol. 54, pp. 185-200.
- ORGEL, A.; BRENNER, S. 1961. Mutagenesis of Bacteriophage T4 by Acridines. J. Mol. Biol. 3 pp. 762.
- ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M. E. A. 1991. Cell. 67, pp. 411-421. Citado por OSUNA, A.; RODRIGUEZ-CABEZAS, N.; BOY, M.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. 1993. The invasion mechanism of the metacyclic forms of *T. cruzi* in nonphagocytic Host Cell. Biol. Res. , Vol. 26, 1, pp. 19-26.
- OSTERTAG, W. 1966. Chemische Mutagenese an Menschlichen Zellen in Kult Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin Math. Naturwiss. KL n<sup>o</sup> 1.
- OSTERTAG, W.; KERSTEN, W. 1965. The action of proflavine and actinomycin D in causing Chromatid Breakage in Human Cells. Exp. Cell Res. 39, p. 296.
- OSUNA, A.; RUIZ-PEREZ, L. M.; GAMARRO, F.; RODRIGUEZ-SANTIAGO, J. I.; CASTANYS, S.; SHARPLES, D.; GALY, A. M.; GIOVANNANGELI, G.; GALY, J. P.; SOYFER, J. C.; BARBE, J. 1988. Chemother. 34, p. 127. Citado por: MESA-VALLE, C. 1991. Tesis Doctoral. Quimioterapia experimental frente a la leishmaniosis visceral. Universidad de Granada. Granada. España.
- OSUNA, A.; CASTANYS, S.; ORTEGA, G.; GAMARRO, F.; ANEIROS, J.; BRAÑA, M. F.; ROLDAN, C. M. 1983. Estudio ultraestructural de la acción de dos derivados benzo(de) isoquinolil-1,3-diona sobre *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 25, pp. 133-8.
- OSUNA, A.; ORTEGA, G.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S.; MASCARO, M. C. 1983. Some factors affecting the "in vitro" invasion of HeLa cells by *T. cruzi*. I. J. Parasitol. 14, pp. 253-257.
- OSUNA, A.; ADROHER, F. J.; LUPIAÑEZ, J. A. 1990. Influence of electrolytes and non-electrolytes on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Cell Differ. Develop. 30; pp. 89-95.
- OSUNA, A.; ORTEGA, G.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S.; MASCARO M. C. 1984. Some factors affecting the in vitro invasion of HeLa cells by *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Parasitol. 14, 253-257.
- OSUNA, A.; RODRIGUEZ-CABEZAS, N.; BOY, M.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. 1993. The invasion mechanism of the metacyclic forms of *T. cruzi* in nonphagocytic Host Cells. Biol. Res. Vol. 26, 1, pp. 19-26.
- OSUNA, A.; CASTANYS, S.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M.N.; GAMARRO, F. 1990. *Trypanosoma cruzi*: Calcium ion movement during internalization in host HeLa cells. Internation. Journ. Parasitol.; 20, 5, pp.673-676.

## BIBLIOGRAFIA

- OSUNA, A.; RUIZ-PEREZ, L. M.; LOPEZ, M. C.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; CRACIUNESCU, D. G.; ALONSO, C. 1987. Antitrypanosomal action of cis-diamminedichloroplatinum II analogs. *J. Parasit.* 73, pp. 272-277.
- OSUNA, A.; JIMENEZ ORTIZ, A.; GUEVARA, D. C. 1980. Cultivo "in vitro" de *T. cruzi* sobre células HeLa: Estudio del ciclo intracelular. *Rev. Iberica de Parasitología.* 2, pp. 189-201.
- OSUNA, A.; RUIZ PEREZ L.M.; GAMARRO, F.; RODRIGUEZ-SANTIAGO, J. I.; CASTANYS, S.; SHARPLES, D.; GALY, A. M.; GIOVANNANGELI, G.; GALY, J. P.; SOYFER, J. C.; BARBE, J. 1988. New Antiparasitic Agents. III. Comparison between Trypanocidal Activities of Some Acridine Derivatives against *T. cruzi* "in vitro". *Exper. Chemother.*, 34, pp. 127-133.
- OSUNA-CARRILLO, A.; JIMENEZ-ORTIZ, A.; LOZANO-MALDONADO, J. 1979. Medios de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Ibér. Parasitol.* 39, 129-133.
- OSUNA, A.; CASTANYS, S.; ORTEGA, G.; GAMARRO, F.; ANEIROS, J.; BRAÇA, M. F.; ROLDAN, C. M. 1983. Estudio ultraestructural de la acción de dos derivados benzo(de) isoquinolil-1,3,-diona sobre *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 25, pp. 133-8.
- OTTO, G. F.; MAREN, T. H.; BROWN, H. W. 1947. Blood levels and excretion rates of antimony in persons receiving trivalent and pentavalent antimonials. *Amer. J. Hyg.*, 46 pp. 193-211.
- PACKCHANIAN, E.; 1957. Chemotherapy of experimental Chagas' disease with nitrofurán compounds. *Antibio. Chemothe.*, 7 pp. 13-23.
- PAN, A. A. 1986. *Leishmania mexicana pifanoi*: Analysis of antigenic relationships between promastigotes and amastigotes by gel diffusion, immunoelectrophoresis, and immunoprecipitation. *J. Protozool.* 33, 192-197.
- PAN, S. Ch. T. 1982. Estudio actual de terapeutica específica de doença de Chagas: revisao dos medicamentos até hoy utilizados. *Rev. guiana Med.* 9 (supl.) pp. 109-124
- PAN, A. A. 1984. *Leishmania mexicana*: Serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. *Exp. Parasitol.* 58, 72-80.
- PANOSIAN, C. B.; BARZA, M.; SZOKA, F.; WYLER, D. J. 1984. Treatment of experimental cutaneous leishmaniasis with liposome-intercalated amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 25 (5) 655-6.
- PAWLAK, J. W.; PAWLAK, K.; KONOPA, J. 1983. The mode of action of Cytotoxic and Anti-tumor I-nitroacridines. II-"In vivo" enzyme-mediated covalent binding of an I-nitroacridine derivative ledakrin or nitramine, with DNA and other macromolecules of mammalian or bacterial cells. *Chem. Biol. Interact.* 43, p. 151.
- PEACOCKE, A. R.; SKERETT, J. N. H. 1956. The Interaction of Aminoacridines with Nucleic Acids. *Trans. Faraday Soc.* 52, p. 261.

- PEARSON, R. D.; HARCUS, J. L.; MANIAN, A. A.; HEWLETT, E. 1981. Lethal effect of phenothiazines on the protozoan *L. donovani*. 21st Interscience Conference Antimicrobial Agents Chemotherapy. Abstract n°. 84.
- PEARSON, R. D.; MANIAN, A. A.; HALL, D.; HARCUS, J. L.; HEWLETT, E. L. 1984. Antileishmanial activity of chlorpromazine. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 25 (5) pp. 571-4.
- PERSON, F.; BRUN, J. 1974. Mutagénese Physique et Chimique chez un Nematode Mycophage *Aphelenchoides Composticola*. (M. T. FRANKLIN, 1957) *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 6; P. 3.
- PETERS, W.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; ROBINSON, B. L.; FRANCA LEAO, A. 1981. Potentiating action of rifampicin and isoniazid against *L. mexicana amazonensis*. *Lancet*, I, pp. 1122-4.
- PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. 1987. En: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vols. I y II. Academic Press. N.Y.
- PETERS, W.; TROTTER, E. R.; ROBINSON, B. L. 1980. The experimental Chemotherapy of leishmaniasis. V. The activity of potential leishmanicides against *L. infantum* LV 9 in NMRI mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 74, pp. 289-98.
- PFALLER, M. A.; MARR, J. J. 1974. Antileishmanial effect of allopurinol. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 5 (5) pp. 469-72.
- PIRAS, R.; PIRAS, M. M.; HENRIQUEZ, D. 1982. The effect of inhibitors of macromolecular biosynthesis on the in vitro infectivity and morphology of *T. cruzi* trypomastigotes. *Mol. and Biochem. Parasitol.* 6 pp. 83-92.
- PIRAS, R.; HENRIQUEZ, D.; PIRAS, R. 1985. The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction *T. cruzi*-fibroblast. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14, pp. 151-163.
- PIRAS, R.; PIRAS, M. M.; HENRIQUEZ, D. 1983. *T. cruzi*-fibroblastic cell interaction necessary for cellular invasion. En: *Cytopathology of parasitic disease*. Ciba Foundation Symposium, Pitman, London, 99 pp. 131-134.
- PRADINAUD, R.; GIRORDEAU, I.; SAINTE-MARIE, D. 1985. Pentamidine excellent drug for the treatment of cutaneous leishmaniasis. Single dose treatment schedule recommended in French Guiana. *Anais Brasileira de Dermatologia*, 60 (6) pp. 385-7.
- PRATA, A.; 1963. Estudo atual de terapêutica específica de doença de Chagas: revisão dos medicamentos até hoje utilizados. *Rev. goiana Med.*, 9 (Supl.) pp. 109-124.
- PRESTON, T. M. 1969. The form and function of the cytostome cytopharynx of the culture forms of the elasmobranch haemoflagellate *Trypanosoma raiae* Laveran and Nesmil. *J. Protozool.*, 16, pp. 320-33.
- PRITCHARD, N. J.; BLAKE, A.; PEACOCKE, A. R. 1966. Modified Intercalation Model for the Interaction of Aminoacridines and DNA. *Nature*, 212, p. 1360.

BIBLIOGRAFIA

PUPKIS, M. F.; COOMBS, G. H. 1984. J. Gen. Microbio. 130, pp. 1501-5. Citado por: MESA-VALLE, C. 1991. Tesis Doctoral. Quimioterapia experimental frente a la leishmaniosis visceral. Universidad de Granada. Granada. España.

RAETHER, W.; SEIDENATH, H.; HOFMANN, J. 1989. Potent antibacterial fluoroquinolones with marked activity against *L. donovani* "in vivo". Parasitol. Research. 75 (5) pp. 412-3.

RAETHER, W.; SEIDENATH, H.; LOEWE, H. 1978. Action of p(4-amidinophenoso)benzaldehyde-p-amidinophenylhydrazono dihidrocloruro on *L. donovani* infecciones in the golden hamster. Ann. Trop. Med. Parasitol., 72; 543-7.

RAINEY, P. M., AND MACKENZIE N. E. 1991. A carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of the products of glucose metabolism in *Leishmania pifanoi* amastigotes and promastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 45, 307-316.

RAINEY, P. M. y col., 1991. Mol. Biochem. Parasitol. 49, pp. 111-118. Citado por: RAINEY, P. M., AND MACKENZIE N. E. 1991. A carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of the products of glucose metabolism in *Leishmania pifanoi* amastigotes and promastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 45, 307-316.

RAJAGUPLALAN, K.V.; FRIDOVICH, I.; HANDLER, P. 1962. Biochem. 237, pp. 922-28. Citado por ZOLLNER, M. 1993. Handbook of Enzyme Inhibitors. V.C.H. ed. N.Y. USA.

RIBEIRO DOS SANTOS, R.; RASSI, A.; KOBERLE, F. 1981. Chagas' disease. In: Antibiotics and Chemotherapy, vol. 30: Antiparasitic Chemotherapy (S. Kager, ed.), Basel pp. 115-134.

RIOU, G.; GUTTERIDGE, W. E. 1978. Comparative study of kinetoplast DNA in culture, blood and intracellular forms of *T. cruzi*. Biochimie., 60, pp. 365-79.

RIOU, J. F.; MULTON, E.; VILAREM, M. J.; LARSEN, C. J.; RIOU, G. 1986. Biochem. Bioph. Res. Commun. 137, p. 1. Citado por ZOLLNER, P. 1993. Handbook of Enzyme Inhibitors; V.C.H. ed. N.Y. USA.

RIOU, G.; 1968. Disparition de l'ADN du kinetoplaste de *T. cruzi* cultivé on presence de Bromure d'ethidium. Comp. Rend. Acad. Sciences, Paris, 266; Série D pp. 250-252.

RIOU, G.; 1976. Establishment and characterization of *T. cruzi* strains resistant to Ethidium bromide. En: Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships (H. Van den Bossche, ed.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 237-244.

RIOU, G. 1967. Introduction d'une dyskinetoplastie par le Bromure d'ethidium chez *T. cruzi* cultivé "in vitro". Comp. Rend. Acad. Sciences, Paris. 265, serie D: pp. 2004-2007.

RIOU, J. F.; GABILLOT, M.; PHILIPPE, M. 1986. Biochem. 25, pp. 1471-82. Citado por ZOLLNER, P. 1993. Handbook of Enzyme Inhibitors; V.C.H. ed. N.Y. USA.

RIZZI, M.; ARICI, C.; BONACCORSO, C. y GAVAZZENI, G.; 1988. Visceral Leishmaniasis in a patient with human immunodeficiency virus. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 82 (4) p. 565.

- ROBERTS, J. J.; THOMSON, A. J. 1979. The mechanism of action of antitumor platinum compounds. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 22 pp. 71-133.
- ROBINSON, N.; KAUR, K.; EMMETT, K.; IOVANNISCI, D. M.; ULLMAN, B. 1984. Biochemical Genetic Analysis of Formycin B Action in *L. donovani*. *J. Biol. Chem.* 259, pp. 7637-43.
- RODRIGUEZ CABEZAS, M. N. 1991. Tesis Doctoral. Estudio y caracterización de proteínas de *T. cruzi* susceptibles de producir cambios en su célula hospedadora. Universidad de Granada.
- ROGERSON, G. W.; GUTTERIDGE, W. E. 1979. Oxidative metabolism in mammalian and culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Biochem.* 10, 1019-1023.
- ROGERSON, G. W.; GUTTERIDGE, W. E. 1977. The action of the respiratory inhibitors on the culture epimastigote blood trypomastigote and intracellular amastigote forms of *T. cruzi*. *Parasitol.*, 25 pp. 43-57.
- ROGERSON, G. W.; GUTTERIDGE, W. E.; 1980. Catabolic metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.*, 10, pp. 131-135.
- ROGERSON, G. W.; GUTTERIDGE, W. E. 1977. Cytochromes in the various stages of *T. cruzi*. *J. Protozool.*, 11, pp. 509-13.
- ROITMAN, I.; GUTTERIDGE, W. E.; 1978. Synthesis of lipids in *Trypanosoma cruzi*. *Pesquisa Basica em Doença de Chagas. V Reuniao Anual, Caxambú, Brasil*, p. 9.
- ROLEMIC, L. J.; KOT, E. J.; LYLIN, R.; Mc CLARY, D. O.; OLSON, V. L. 1973. Growth and Structural Characteristics of Acriflavine Induced Mutants of *Candida albicans*. *Abstr. Ann. Meet. Soc. Microbiol.* 73, p. 52.
- ROSALES LOMBARDO, M. J. 1992. Tesis Doctoral. Cultivo "in vitro" de *Cryptosporidium*. Universidad de Granada. Granada. España.
- ROSSI, P.; POZIO, E.; BESSE, M. G. 1990. Cryopreservation of *Cryptosporidium sp.* oocysts. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 84 (1), p. 68.
- RUIZ-PEREZ, L. M.; OSUNA, A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; CRACIUNESCU, D.; DOADRIO, A. 1986. Evaluation of the toxicity of Rh(III) and Pt(II) complexes against *T. cruzi* culture forms. *Drug-Research*, 36, pp. 13-16.
- RUIZ-PEREZ, L. M. 1985. Tesis Doctoral. Estudio de la acción "in vitro" e "in vivo" de nuevos complejos metálicos sobre *T. cruzi*. Universidad de Granada.
- RUIZ-PEREZ, L. M.; OSUNA, A.; LOPEZ, M. C.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; CRACIUNESCU, D.; ALONSO, C. 1987. Mode of action of intercalating drug, cis-Pt(II)(DDH)Cl<sub>2</sub>, cis-Pt(II)(DDH)(metafluorobenzoic)<sub>2</sub> and cis-Pt(II)(mucobromic)<sub>2</sub> on *T. cruzi*. *Trop. Med. Parasitol.* 38, pp. 45-8.



BIBLIOGRAFIA

---

RUIZ-PEREZ, L.M.; OSUNA, A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; CRACIUNESCU, D.; DCADRIO, A. 1986. Evaluation of the toxicity of Rh(III) and Pt(II) complexes against *T. cruzi* culture forms. *Drug Research*, 36, pp. 13-16.

RYLEY, J. F. 1956. Studies on the metabolism of the Protozoa, 7. Comparative carbohydrate metabolism of eleven species of trypanosome. *Biochem. J.* 62, 215-222.

RYLEY, J. F. 1962. Studies on the metabolism of protozoa. 9. Comparative metabolism of bloodstream and culture forms of *Trypanosoma rhodesiense*. *Biochem. J.* 85: 211-223.

SANCHEZ-MORENO; MONESTIER, A; BECERRA, C. F.; LOPEZ-GAY, J.; OPPERDOES, F. R.; OSUNA, A. 1993. In vitro culture of *Phytomonas* sp.; isolated from *Euphorbia characias*. Metabolic studies by <sup>1</sup>H-NMR. *J. Protozool.* En prensa.

SARABHAIA, A.; LAMFROM, H. 1969. Mechanism of Proflavine Mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 63, p. 1196.

SATI, M. H.; 1942. Antimony treatment of Sudan kala-azar. *Annals of Tropical Medicine and Hygiene*, 36 pp. 1-8.

SCHECHTER, P. J.; BARLOW, J. L. R.; SJOERDSMA, A. 1987. Clinical aspects of inhibition of DFMO in cancer and protozoan diseases, in *Inhibition of Polyamine Metabolism*. P. P. McCann, A. E. Pegg, and A. Sjoerdsma, Eds. (Academic Press, N. Y. 1987), pp. 345-364.

SCHLEMPER, B. R.; CHIARI, E. y BRENER, Z.; 1977. Growth-inhibition drug test with *Trypanosoma cruzi* culture forms. *J. Protozool.*, 24 (4) pp. 544-547.

SEN GUPTA, P. C. 1953. Chemotherapy of leishmanial diseases: a resume of recent researches. *Ind. Med. Gaz.*, 88 pp. 20-35.

SENSTARK, A.; ROSNER, J.L. 1964. Chemically Induced Reversions in the cys-c-region of *Salmonella Typhimurium*. *Genetics*, 49, p. 343.

SESNOWITZ-HORN, S.; ALDELBERG, E. A. 1968. Proflavine Treatment of *E. Coli*: Generation of Frameshift Mutations. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33, p. 393.

SHAMES, S. L.; FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A.; WALSH, C. T. 1986. *Biochemistry*. 25; p. 3519. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. Trypanotione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.

SHAPIRA, M., McEWAN, J. C. AND JAFFE, C. L. (1988). Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *EMBO J.* 7, 2895-2901.

SHARPLES, D.; BARBE, J.; GALY, A. M.; GALY, J. P. 1987. New antiamebic acridines. II. Synthesis and DNA binding of a series of 9-acridanones and 9-iminoacridines. *Chemotherapy*. 33, pp. 347-354.

- SHEEN, M. R.; KINM, B. K.; PARKS, R. F. 1968. Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes. III. Inhibition by the inosine analogue formycin B of the isolated enzyme and of nucleoside metabolism in intact erythrocytes and sarcoma. *Mol. Pharmacol.*, 4 (3), pp. 293-9.
- SIMON, M. W., MARTIN, E. AND MUKKADA, A. J. (1978). Evidence for a functional glyoxylate cycle in the *Leishmaniae*. *J. Bacteriol.* 135, 895-899.
- SIMS, P.; GUTTERIDGE, W. E.; 1979. Mode of action of a 5-nitrofuran drug (SQ 18.506) against *T. cruzi*. *Int. J. Parasitol.*, 9 (1): 61-67.
- SIMS, P.; GUTTERIDGE, W. E.; 1976. Biochemical effect and mode of action of a 5-nitrofuran drug, SQ 18.506, on *T. cruzi*. De: *Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships* (H. van den Bossche, ed) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 485-491.
- SIVARAMA-SASTRY, K.; GORDON, M. P. 1966. The Photodynamic Inactivation of Tobacco Mosaic Virus and its Ribonucleic Acid by Acridine Orange. *Biochem. Biophys. Acta*, 129, p. 32.
- SMEJKAL, R. M., WOLFF, R., AND OLENICK, J. G. 1988. *Leishmania brasiliensis panamensis*: Increased infectivity resulting from heat shock. *Exp. Parasitol.* 65, 1-9.
- SMEJKAL, R. M., GELLER, R., HANSEN, B. D., AND OLENICK, J. G. 1984. A two-dimensional gel electrophoresis analysis of the conversion of *Leishmania brasiliensis panamensis* promastigotes to amastigotes forms. *Fed. Proc.* 43, 1791-1795.
- SOUTO-PADRON, T. , DE SOUZA, W. 1982. Fine structure and cytochemistry of peroxisomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *Cell Tissue Res.* 222: 153-158.
- SPECTOR, T. 1977. Inhibition of urate production by allopurinol. *Biochem. Pharmacol.*, 26 (5) 355-8.
- SROBODA, G. H.; POORE, G. A.; SIMPSON, P. J.; BODER, G. B. 1966. *J. Pharm. Sci.* 55, p. 758. Citado por :BERNY, H.; BSIRI, N.; CHARBIT, J. J.; GALY, A. M.; SOYFER, J. C.; GALY, J. P.; BARBE, J.; SHARPLES, D.; MESA-VALLE, C.; MASCARO, C.; OSUNA, A. 1992. 1,4-Dimetoxi-9(10H)-acridinone Derivatives. *Drug. Res.* 42 (I), 5, pp. 674-679-
- STECK, E. A. 1974. The leishmaniasis. In *Progress in drug research*. (E. Jucker, Ed.) Birkhauser Verlag: Basel and Stuttgart pp. 289-351.
- STECK, E. A.; 1981b. The chemotherapy of protozoae infections: Whither. *J. Protozool.*, 28 (1) pp. 30-35.
- STECK, E. A.; 1981a. The chemotherapy of protozoae infections of man. *J. Protozool.*, 28 (1) pp. 10-16.
- STECK, E. A. 1976. Chemoterapy of Leishmaniasis. Fourth Latin American Congress of Parasitology. Office of Publications of the University of Costa Rica, San Jose, 143-65.
- STEIGER, R. F.; VAN HOOFF, F.; BONTEMPS, J.; NYSSSENS-JADIN, M.; DRUETZ, J. E. 1979. Acid hidrolases of trypanosomatid flagellates. *Act. Trop.*, 36, 335-341.

- STERLING Drug Inc. 1977. Acridine derivatives. Japan. K. 77-142077.
- STEWART, C. R. 1968. Mutagenesis by Acridine Yellow in *Bacillus Subtilis*. *Genetics*, 59, p. 23.
- STINSON, S., SOMMER, J. R., AND BLUM, J. J. 1989. Morphology of *Leishmania brasiliensis*: Change during reversible heat-induced transformation from promastigotes to an ellipsoidal form. *J. Parasitolog.* 75, 431-440.
- STOHLMAN, S. A.; KUWAHARA, S. S.; KAZAN, B. H. 1973. Enzyme, protein and nucleic acid content of two morphological forms of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Arch. Mikrobiol.*, 92, pp. 301-311.
- STREISINGER, G.; OKADA, Y.; EMRICH, J.; NEWTON, J.; TSUGITA, A.; TERZAGAI, E. INOUE, M. 1966. Frameshift Mutations and the Genetic Code. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. 31, 77.
- SUBRAMANIAN, M.; KOVACS, Z.; LESIAS, K.; TORRENCE, P. F.; LENARD, J. 1990. *Antiv. Res.* 13, 2, pp. 81-9. Citado por ZOLLNER, P. 1993. *Handbook of Enzyme Inhibitors*; V.C.H. etd. N.Y. USA.
- SULLIVAN, F. X.; SHAMES, S. L.; WALSH, C. T. 1989. *Expression Biochem.* 28, p. 4986. Citado por FAIRLAMB, A. H. 1991. *Trypanotione Metabolism in the Chemotherapy of Leishmaniasis and Trypanosomiasis*. En: *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. 1991. C.C. Wang ed. USA.
- SYLVESTER, D.; KRASSNER, P. 1976. Proline Metabolism in *T. cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55 B, pp. 443-48.
- SZIMIGIERO, L.; SLASKA, K.; CIELSKA, E.; JAROS-KAMINSKA, B.; GNIAZDOWSKI, M. 1977. Structure of Acridines and their effect of RNA-Synthesis "in vivo". *Acta Bioch. Pol.* 24, p. 35.
- TAYLOR, M. B. , BERGHAUSEN, H. , TEYWORTH, P. , MESSENGER, N. , REES, L. J. , GUTTERIDGE, W. E. 1979. Subcellular localization of some glycolytic enzymes in parasitic flagellated protozoa. *Int. J. Biochem.* 11; pp. 117-120.
- THAKUR, C. P. 1986. Harmful effect of high sibogluconate treatment of kala-azar in India. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80 (4) pp. 672-3.
- THOMPSON, S. N. 1991. Applications of nuclear magnetic resonance in parasitology. *J. Parasitol.* 77(1), 1991, 1-20.
- TOLSON, D. L.; TURCO, S. J.; PEARSON, T. W. 1990. Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with *L. donovani*. *Infection and Immunity*, 58, pp. 3500-7.
- TONER, J. J.; WEBER, M. M. 1972. Respiratory control in mitochondria from *Crithidia fasciculata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, pp. 652-660.

- TRAGER, W. 1974. In: Ciba Foundation Symposium, 20, pp. 225-246. Citado por: MESA-VALLE, C. 1991. Tesis Doctoral. Quimioterapia experimental frente a la leishmaniosis visceral. Universidad de Granada. Granada. España.
- TRAININ, N.; KAYE, A. M.; BERENBLUM, I. 1964. Influence of Mutagens on the Interaction of DNA with Acriflavine. *Biochem. Pharmacol.* 13, p. 263.
- TRANG, N. L.; MESHNICK, S. R.; KITCHENER, K.; EATON, J. W.; CERAMI, A. 1983. Iron-Containing Superoxido Dismutase from *C. fasciculata*. *J. Bio. Chem.* 258. pp. 125-30.
- TROTTER, E. R.; PETERS, W.; ROBINSON, B. L. 1980. The experimental chemotherapy of leishmaniasis. IV. The development of rodent models for visceral infection. *An. Trop. Med. Parasitol.*, 74, pp. 127-38.
- TROUET, A.; DEPREZ-DE CAMPENEERE, D.; DE DUVE, C. 1972. Chemotherapy through lysosomes with a DNA-Daunorubicin complex. *Nature, New Biol.*, 239 pp. 110-112.
- TROUET, A.; JADIN, J.M.; VAN HOFF, F. 1976. Lysosomotropic chemotherapy in protozoae diseases. In: *Biochemistry of Parasites and Host-Parasite relationships* (H. Van den Bossche, ed.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 477-484.
- TUBBS, R. K.; DITNARS, W. E.; VAN WINKE, Q. 1964. Heterogenicity of the Interactions of DNA with Acriflavine. *J. Mol. Biol.* 9, p. 545.
- TURCO, S. J.; WILKERSON, M. A.; CLAWSON, D. R. 1984. Expression of an Unusual Acidic Glycoconjugate in *L. donovani*. *J. Biol. Chem.* 259, pp. 3883-9.
- UCROS, H.; LEON, W.; KRASSNER, S. M.; 1977. *T. cruzi*: effect of ethidium bromide on growth, diskinetoplasty, and respiration of the Y and Costa Rica strains. *Exp. Parasitol.*, 41; pp. 410-414.
- TURCO, S. J.; McLEAN, D. L.; MCNEELY, T. B. 1990. Survival of *Leishmania* parasites within phagocytic cells - requirement for lipophosphoglycan. *Glycobiology*, 111, pp. 23-4.
- UMEZAWA, H.; SAWA, T.; FUKUGAWA, Y.; HOMMA, I.; ISHIZUKA, M.; TAKEUCHI, T. 1967. Studies on formycin and formycin b in cells of Ehrlich carcinoma and *E. coli*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 20, pp. 308-16.
- VAN DUUREN, B.L.; GOLDSCHMIDT, B. M.; SELTZMANN, H.H. 1969. Interaction of Mutagenic and Carcinogenic Agents with Nucleic Acids. *Ann. New-York Acad. Sci.* 153, 744.
- VAN DER PLOEG, L. H. T., GIANNINI, S. H., AND CANTOR, C. R. 1985. Heat shock genes: Regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science* 228, 1443-1446.
- VAN DEN BOSSCHE, H.; WILLEMSSENS, G.; COOLS, W.; LAUWERS, W. F. S.; LE JEUNE, L. 1978. Biochemical effects of miconazole on fungi. II. Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Chem. Biol. Interact.* 21 pp. 59-78.
- VAN DEN BOSSCHE, H. 1976. The molecular basic antihelminthic action. In: Van den Bossche H. (ed.) *Biochemistry of parasites and host-parasite relationship*. Amsterdam, Elsevier/north Holland Biomedical Press. pp. 553-572.

BIBLIOGRAFIA

---

- VAN SCHAFTINGEN, E. , OPPERDOES, F. R. , HERS, H. G. 1985. Stimulation of *T. brucei* pyruvate kinase by fructose 2,6-bisphosphate. Eur. J. Biochem. 153: 403-406.
- VAN DUUREN, B. L.; SIVAK, A.; KATZ, C.; MLOHIONNE, S. 1969. Tumorigenicity of Acridine Orange. Br. J. Cancer, 23, p. 587.
- VEIGA, J. P. R.; ROSA, T. T.; KIMACHI, T.; WOLFF, E.; SAMPAIO, R. N.; GAGLIARDI, A. R. T.; JUNQUE, L.; COSTA, J. M. L.; MARSDEN, P. D. 1985. Renal function in patients with mucocutaneous leishmaniasis treated with pentavalent antimonials. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 27 pp. 298-302.
- VELJKOVIC, V.; LALOVIC, D. 1978. Correlation between the Carcinogenicity of Organic Substances and their spectral characteristics. Experientia, 34, p. 1342.
- VIALLET, J.; MACLEAN, J. D.; ROBSON, H. 1986. Response to ketoconazole in two cases of longstanding cutaneous leishmaniasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 35 (3), pp. 491-5.
- VICKERMAAN, K. 1971 . In Ecology and Physiology of Parasites, ed. A.M. Fallis, pp. 58-91. Toronto: Univ. Toronto Press.
- VICKERMAN, K. , PRESTON, T. M. 1976. Comparative cell biology of the kinetoplastic flagellates, in: Biology of the *Kinetoplastida* (W.H.R. Lumsden and D.A. Evans, Eds.) Vol. 1., pp. 35-130. Academic Press, New York.
- VICKERMAN, K. 1965. Polymorphism and mitochondrial activity in sleeping sickness trypanosomes. Nature 208 : 762-766.
- VISSER, N. , OPPERDOES, F. R. , BORST, P. 1981. Subcellular compartmentation of glycolytic intermediates in *Trypanosoma brucei*. Eur. J. Biochem. 118: 521-526.
- VISSER, N. , OPPERDOES, F. R. . 1980. Glycolysis in *Trypanosoma brucei*. Eur. J Biochem. 103: 623- 632.
- VON BRAND, T. 1979. Biochemistry and Physiology of Endoparasites. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- VON BRAND, T.; TOBIE, E. J.; KISSLING, R. E.; ADAMS, G. 1949. Physiological and pathological observations on four strain of *Trypanosoma cruzi*. J. Infect. Dis. 85, 5-16.
- WALTZER, P. D.; PERL, D.P.; KROGSTOD, D. J.; RAWSON, P. G.; SCHULTZ, M. G. 1974. Pneumocistis carinii pneumonia in the United States. Annals of International Medicine, 80 pp. 83-93.
- WARREN, L. G. 1960. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* (Chagas). I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. J. Parasitol. 46, 529-539.
- WEILL, G.; CALVIN, M. 1963. Optical Properties of Chromophore Macromolecules Complexes: Fluorescence of Acridine Dye Bound to Polyphosphates and DNA. Biopolymers. I, p. 401.

- WEIN, R. 1943. The pharmacological action of certain aromatic diamidines possessing trypanocidal activity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 37 pp. 1-18.
- WEINRAUCH, L.; EL-ON, J. 1984. The effect of ketoconazole and a combination of rifampicin/amphotericin B on cutaneous leishmaniasis in laboratory mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 78 (3) pp. 389-90.
- WOOD, D. E. 1975. *T. cruzi*: fatty acid metabolism "in vitro". *Exp. Parasitol.*, 37, pp. 60-66.
- WU, J. S.; HUANG, S.; KUOK, C. S. 1988. *Phytochem.* 27, p. 585. Citado por :BERNY, H.; BSIRI, N.; CHARBIT, J. J.; GALY, A. M.; SOYFER, J. C.; GALY, J. P.; BARBE, J.; SHARPLES, D.; MESA-VALLE, C.; MASCARO, C.; OSUNA, A. 1992. 1,4-Dimetoxy-9(10H)-acridinone Derivatives. *Drug. Res.* 42 (I), 5, pp. 674-679-
- WYNNE DE MARTINI, G. J.; ABRAMO ORREGO, L.; DE RISSIO, A. M.; ALVAREZ, M.; MUJICA, L. P. 1980. Cultivo de *Trypanosoma cruzi* en un medio monofásico. Su aplicación en cultivos en gran escala en procesos de fermentación. *Medicina* 40 (Supl.1), 109-114.
- YASUMURA, Y.; KAWAKITA, Y. 1963. *Nippon Rinsho*, 21, p. 1209. Citado por: HAY, R.; MACY, M.; CHEN, T. R. 1988. McClintock and Reid, Y. Eds. American Type Culture Collection. Catalogue of cell lines and hybridomas. (6 Ed.) Rockville. Maryland (USA).
- YOSHIDA, N.; CAMARGO, E. P. 1978. Ureotelism and ammonotelism in Trypanosomatids. *J. Bacteriol.* 136, 1184-1186.
- YUSUPOV, K. A.; DZHAKSIM, A. K.; TURSUNOV, S. S. 1981. Tashkent, ussr Thashkentskii Gosudarstvennii Meditsinskii Institut. pp. 47-53.
- ZAMENHOF, P. J. 1969. On the identity of two Bacterial Mutator Genes. Effect of Antimutagens. *Mutation Res.* 7, p. 463.
- ZAMPIERI, A.; GREENBERG, J. 1964. Nitrofurazone as a Mutagen in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, p. 172.
- ZAMPIERI, A.; GREENBERG, J. 1965. Mutagenesis by Acridine Orange and Proflavine in *E. coli* Strain. *Mutation Res.* 2, 552.
- ZILBERSTEIN, D., BLUMENFELD, N., LIVEANU, V., GEPSTEIN, A. AND JAFFE, C. L. Growth at acidic pH induces an amastigote stage-specific protein in *Leishmania* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45, 1991 pp. 175-178.
- ZILBERSTEIN, D.; DWYER, D. M. 1984. Glucose transport in *L. donovani* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 12, pp. 327-36.
- ZINSSTAG, J.; GRUN, R.; CRACIUNESCU, D. G.; PARRONDO IGLESIAS, E. 1991. "In vitro" activity of organometallic complexes of Ir, Pt and Rh on *Trypanosoma b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* and *T. b. brucei*. *Trop. Med. Parasitol.* 42, pp. 41-44.
- ZOLLNER, P.; 1993. Handbook of Enzyme Inhibitors. V.C.H. eds. N.Y. U.S.A.