

Estudios en honor de
Gustavo Hoecker
AUCH, 5ª serie. N° 14 (1987): 33-48

ENFERMEDAD DE CHAGAS, BIOTRANSFORMACIÓN DE XENOBIÓTICOS POR EL *TRYPANOSOMA CRUZI*

ANTONIO MORELLO, MARÍA EUGENIA LETELIER,
JORGE ALDUNATE Y YOLANDA REPETTO

INTRODUCCIÓN

La Trypanosomiasis americana más conocida como enfermedad de Chagas es causada por un protozoo flagelado llamado *Trypanosoma cruzi*. Este parásito fue descubierto en 1909 por el célebre científico brasileño Carlos Chagas, quien le dio el nombre de *T. cruzi* en honor a su profesor Osvaldo Cruz.

La enfermedad de Chagas afecta en América aproximadamente a 24 millones de personas distribuidas desde el sur de California hasta Argentina y Chile (Schofield, 1985). De las enfermedades latinoamericanas ligadas a vectores es, después de la malaria, la de mayor prevalencia.

El *Trypanosoma cruzi* presenta tres aspectos morfológicos fundamentales que se caracterizan por las posiciones relativas del flagelo, kinetoplasto y núcleo. Así, la forma triponomastigoto posee un kinetoplasto subterminal, posterior al núcleo, y un flagelo que emerge por el extremo anterior. Se encuentra en la sangre de los mamíferos y en el intestino posterior de los triatominos. No se multiplica, pero constituye la forma infectante para los mamíferos y los triatominos.

La forma epimastigoto posee un kinetoplasto localizado por delante

Departamento de Bioquímica y Química. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
Casilla 70086, Santiago 7, Chile.

del núcleo y presenta una corta membrana ondulante y un flagelo libre. Es la forma de multiplicación del parásito en el intestino del triatomino y la predominante en los medios de cultivo.

La forma amastigoto es redonda a diferencia de las formas anteriormente mencionadas que son alargadas. Al microscopio de luz se observa el núcleo y el kinetoplasto pero no el flagelo; sin embargo, las observaciones al microscopio electrónico han determinado la presencia de un flagelo corto, no emergente. Es la forma de multiplicación del parásito en el huésped mamífero y lo hace en el interior de las células. Pueden ser cultivados en células musculares, fibroblastos y macrófagos.

Los vectores de la enfermedad son insectos que pertenecen a la familia de los triatominos, son hematófagos estrictos y están representados por diversos géneros de triatomas. Así los vectores más importantes para el ciclo doméstico de la enfermedad son: el *Panstrongylus magistus*, el *Triatoma infestans* (vinchuca) y el *Rhodnius prolixus*, y para el ciclo selvático, el *Panstrongylus geniculatus*, el *Panstrongylus lignarus*, el *Triatoma spinolai* y el *Triatoma dimidiata*.

El parásito se transmite en el momento que el insecto infectado pica al mamífero. Conjuntamente con picar, el insecto emite deyecciones en las cuales elimina los tripomastigotos que atraviesan la piel por el sitio de la picadura o por las mucosas. Este modo de transmisión asociado con el insecto vector es aun el más importante, pero las infecciones por transfusión sanguínea aumentan cada día en la medida que las personas del área rural se trasladan a zonas urbanas. Así, estudios serológicos realizados en Bancos de Sangre ubicados en zonas endémicas, han mostrado porcentajes de positividad que fluctúan entre un diez y un cincuenta por ciento. Existen indicaciones que alrededor del 10% de las personas receptoras de sangre infectada puede llegar a infectarse. Corrientemente se ha usado Violeta de Genciana para tratar la sangre infectada y de esta forma poder usarla en transfusiones. Sin embargo, este tratamiento colorea la sangre que a su vez puede teñir los tejidos de los pacientes transfundidos.

Diversos métodos se están usando hoy en día para erradicar esta enfermedad. Así, por ejemplo, se están realizando campañas para eliminar los vectores con insecticidas, mejoramiento de las viviendas, campañas educacionales, especialmente entre personas jóvenes (Schofield, 1985). El desarrollo de una vacuna contra la infección producida por *T. cruzi* no ha tenido éxito aún.

La quimioterapia de la enfermedad de Chagas es aún muy inadecuada ya que el tratamiento de pacientes con las drogas en uso: Nifurtimox (4-(5-nitrofurfurilidenamino)-3-metilmorfolin-11-dióxido) y el Benznidazol (N-bencil-2-nitro-1-imidazol-acetamida) está asociado con una alta

incidencia de algunos efectos colaterales serios. Además, no está claramente establecido que estas drogas produzcan una cura parasitológica.

Esta revisión se referirá a los procesos bioquímicos de destoxicación de xenobióticos (drogas) que se han estudiado en *T. cruzi*. Estos aspectos de la bioquímica del parásito son importantes ya que podrían ayudar a la comprensión de la acción de las drogas y al desarrollo de nuevos fármacos antichagásicos tan necesarios en estos momentos.

Los procesos de biotransformación son generalmente, la causa principal por la cual los xenobióticos, compuestos extraños al organismo, pierden sus efectos farmacológicos o tóxicos, razón por la cual a estos procesos se les ha llamado "mecanismos de destoxicación". Muchos de los xenobióticos son liposolubles y al ser metabolizados se transforman en compuestos hidrosolubles, más fácilmente excretables que sus precursores. Entre los xenobióticos más comunes se encuentran los fármacos, los pesticidas, aditivos de alimentos y contaminantes ambientales (Jacoby, 1980).

Se han observado marcadas diferencias entre especies en relación con la actividad biológica de los xenobióticos. Los orígenes de estas diferencias involucran procesos tales como la absorción, distribución y excreción de ellos, pero la experiencia muestra que estas variaciones generalmente radican en diferencias en el metabolismo de los xenobióticos (Dixon y col., 1977, y Caldwell, 1976).

Es razonable postular que las variaciones metabólicas entre especies se deben a diferencias en las actividades de las enzimas responsables de las diferentes transformaciones. Tales variaciones podrían originarse de diferencias en: a) las actividades absolutas de las enzimas, b) los patrones de isoenzimas, o c) las concentraciones de cofactores endógenos tales como NADPH, GSH, UDPGA, UDPG, etc. Así, por ejemplo, el fenómeno de resistencia a compuestos químicos es generalmente debido a un aumento en la concentración de las enzimas de destoxicación (Letelier y col., 1984 y 1985). Uno de los casos más conocidos de resistencia es el desarrollado por los insectos contra insecticidas. En general, la causa de esta resistencia se debe a la selección de genes ya presentes en la población.

Las razones por las cuales los agentes quimioterapéuticos no producen los efectos esperados en el *Trypanosoma cruzi* aún no se conocen; sin embargo, se cree que mecanismos de destoxicación del parásito podrían jugar un rol.

Las enzimas de destoxicación estudiadas en *Trypanosoma cruzi* son: el citocromo P-450, la epóxido-hidrasa, la glutatión-S-transferasa, las carboxilesterasas y las fosfatasas.

Los procesos de destoxicación presentan generalmente dos características: la naturaleza lipofílica de los sustratos que son metabolizados a

través de estos procesos y la baja especificidad de las enzimas que participan en ellos. Esta última característica permite que una sola enzima metabolice muchos xenobióticos químicamente relacionados. Por otra parte, las enzimas metabolizantes de xenobióticos tienen altas K_m y bajas $V_{máxima}$ comparadas con las enzimas que participan en otro tipo de procesos metabólicos.

SISTEMA DEL CITOCROMO P-450

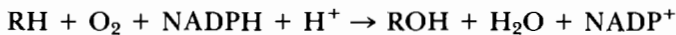
Este sistema enzimático es notablemente versátil, no sólo por la diversidad de compuestos que puede oxidar, sino también por los diferentes tipos de reacciones que es capaz de catalizar. Así, este sistema metaboliza xenobióticos de muy distinta estructura química tales como hidrocarburos aromáticos y alifáticos, drogas, pesticidas, compuestos carcinogénicos, etc., y también compuestos de importancia fisiológica como son las hormonas esteroidales. Entre las reacciones que este sistema es capaz de catalizar cabe destacar las hidroxilaciones alifáticas y aromáticas, las N-, S- y O-desalquilaciones, las sulfoxidaciones, las epoxidaciones, y las N-oxidaciones (Coon and Persson, 1980).

En la actualidad este sistema ha sido solubilizado, purificado a homogeneidad todos sus componentes (NADPH-citocromo P-450 reductasa, citocromo P-450 y diacil glicerol fosfatidilcolina) y reconstituido para dar un sistema activo cuando se le agrega $NADPH_2$ y O_2 .

En estas reacciones el citocromo P-450 cataliza la transferencia de un átomo de oxígeno, desde el oxígeno molecular a una molécula orgánica. El otro átomo de oxígeno es reducido a agua. Los electrones involucrados en la reducción se obtienen del $NADPH_2$, reacción que es catalizada por la enzima NADPH citocromo P-450 reductasa (Lu y col., 1969).

Este sistema es inducible por muchos compuestos químicos tales como fenobarbital e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Se han purificado diversas formas de citocromo P-450 y todas ellas catalizan más de una reacción pero poseen selectividad parcial para algún sustrato.

La reacción general catalizada por el sistema del citocromo P-450 es la siguiente:



RH representa un sustrato orgánico y ROH el producto resultante de su oxidación.

La presencia de citocromo P-450 en *T. cruzi* fue sugerida por De Boiso y Stoppani (1971). Estos investigadores trabajando con microsomas de epimastigotos de *T. cruzi* detectaron en un espectro diferencial con monóxido de carbono, un pigmento que poseía un máximo de absorbancia a

420 nm. Aparentemente este pigmento corresponde a citocromo P-420, la forma catalíticamente inactiva del citocromo P-450 (Fujita y col., 1973).

Posteriormente, Agosin y colaboradores (1976a) demostraron que epimastigotos de *T. cruzi in vivo* eran capaces de hidroxilar varias drogas tales como, p-Nitroanisol, aminopirina y anilina. Más aun, la actividad aumentaba al agregar fenobarbital al medio de crecimiento de los epimastigotos (Tabla 1). La reacción de hidroxilación era inhibida por CO, SKF-525 A, metirapona y por la ausencia de O₂. Estos resultados claramente indicaron la participación del citocromo P-450 en estas reacciones de hidroxilación. Observaciones espectroscópicas de fracciones microsomales de *T. cruzi* han confirmado la presencia del citocromo P-450 (Agosin y col., 1976b; Agosin y col., 1984). En *T. cruzi*, a igual que en otros eucariontes, parecen existir múltiples formas del citocromo P-450 (Agosin y col., 1984).

Metronidazol es una droga ampliamente usada en el tratamiento de infecciones protozoarias (Muller, 1981), sin embargo *T. cruzi* es resistente a esta droga (Malanga y col., 1981). Se ha demostrado que los epimastigotos de *T. cruzi* metabolizan metronidazol a un compuesto polar bajo condiciones aeróbicas (Agosin, 1983 y Tabla 1). Esta reacción enzimática fue inducida por el tratamiento con fenobarbital de los cultivos del parásito e inhibida por SKF-525A y metirapona (Agosin, 1983). Estos experimentos demostraron la importancia del citocromo P-450 en los procesos de detoxificación del *T. cruzi* y podrían explicar en parte la resistencia de estos organismos a conocidos agentes antimicrobianos.

EPÓXIDO-HIDRASA

Los epóxidos son especies químicas altamente reactivas debido a la tensión de enlace del anillo y a su polarización. La reacción de hidratación catalizada por la epóxido-hidrasa transforma un epóxido electrofílico en un diol vecinal que no es electrofílicamente reactivo (Oesch, 1980). Si el diol es el producto de una molécula hidrofóbica grande tal como el benzo(a)pireno, podría nuevamente servir como sustrato del sistema citocromo P-450 resultando un diol-epóxido como producto. Algunos de estos dioles-epóxidos pueden ser mutagénicos, citotóxicos o carcinogénicos. Los epóxidos o dioles-epóxidos pueden ser también sustratos de otras reacciones, las que deben ser consideradas al evaluar la importancia relativa de la epóxido-hidrasa. Así por ejemplo, muchos epóxidos reaccionan con glutatión y son sustratos de las glutatión-transferasas.

El primero y único estudio sobre la epóxido-hidrasa en *T. cruzi* fue hecho por Yawetz y Agosin (1979). Ellos comunicaron que la actividad

TABLA 1
ACTIVIDADES *IN VIVO* DE LAS ENZIMAS DESTOXICANTES EN
TRYPANOSOMA CRUZI

Enzima y sustrato usado	*Actividad pmoles de sustrato $\times 10^{-7}$ /min/célula	Referencias
<i>Citocromo P-450</i> ¹		
p-nitroanisol	1,15	Agosin y col., 1976a
p-nitroanisol ²	2,98	Agosin y col., 1976a
Aminopirina	1,15	Agosin y col., 1976a
Aminopirina ²	2,30	Agosin y col., 1976a
Anilina	2,74	Agosin y col., 1976a
Anilina ²	6,88	Agosin y col., 1976a
Metronidazol	18,30	Agosin, 1983
Metronidazol ²	38,00	Agosin, 1983
<i>Epóxido-hidrasa</i>		
óxido de estireno	0,52	Yawetz y Agosin, 1979
óxido de estireno ²	1,03	Yawetz y Agosin, 1979
<i>Glutación-S-transferasa</i>		
1-cloro-2,4-dinitrobenceno	9,30	Yawetz y Agosin, 1979
óxido de estireno	0,32	Yawetz y Agosin, 1979
óxido de estireno ³	0,15	Yawetz y Agosin, 1979
<i>Carboxilesterasas</i>		
p-nitrofenil-acetato	4.425	Aldunate y col., 1987
p-nitrofenil-propionato	13.125	Repetto <i>et al.</i> , 1983
p-nitrofenil-butarato	13.750	Repetto <i>et al.</i> , 1983
p-nitrofenil-valerato	16.250	Repetto <i>et al.</i> , 1983
p-nitrofenil-caproato	7.250	Repetto <i>et al.</i> , 1983
p-nitrofenil-caprilato	12.500	Repetto <i>et al.</i> , 1983
<i>Fosfatasas</i>		
p-nitrofenil-fosfato	1.500	Letelier y col., 1985
<i>γ-Glutamiltanspeptidasa</i>		
L- γ -glutamil-p-nitroanilina ⁴	519	Repetto y col., 1987

¹Los epimastigotos de *T. cruzi* contienen 8,75 pmoles de citocromo P-450 por célula (Agosin y col., 1976a).

²Los cultivos del parásito fueron pretratados con fenobarbital.

³La epóxido-hidrasa fue inhibida por la adición de 4-cloro-fenil-2,3- epoxipropil-éter.

⁴Epimastigotos homogeneizados más glicil-glicina 20 mM y γ -glutamil-p-nitroanilina 1 mM.

*Actividades recalculadas de las referencias indicadas.

enzimática encontrada en microsomas de epimastigotos de *T. cruzi* era similar a aquella encontrada en piel (Oesch, 1973). Las velocidades de hidratación encontradas *in vivo* son de igual magnitud que las de las reacciones catalizadas por el citocromo P-450 (Agosin y col., 1976, y Tabla 1). Esto sugiere que la epóxido-hidrasa no sería la etapa limitante del metabolismo de los epóxidos resultantes de la acción del sistema citocromo P-450.

La epóxido-hidrasa de *T. cruzi* no parece diferir significativamente de la enzima de hígado de rata (Oesch, 1980) con respecto a Km aparente, pH óptimo e inducción por fenobarbital. Sin embargo, la enzima de *T. cruzi* a diferencia de lo que ocurre con la epóxido-hidrasa de mamífero, es inhibida *in vivo* por el compuesto 4-clorofenil-2,3-epoxipropil éter (Yawetz y Agosin, 1979; Oesch y col., 1971).

GLUTATIÓN Y ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA FORMACIÓN DE ÁCIDOS MERCAPTÚRICOS

El glutatión (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) se encuentra mayoritariamente en el interior de las células en concentraciones que fluctúan entre 0,5 y 10 mM. Las funciones biológicas asignadas a este tripéptido están relacionadas con dos de sus características estructurales: el grupo sulfhidrilo (-SH) y el grupo glutamilo unido en posición γ .

Entre los roles destoxicantes y protectivos del glutatión es importante nombrar su capacidad para reaccionar enzimáticamente y no enzimáticamente con compuestos de alto poder electrofílico, tales como aquellos producidos por el sistema oxidativo del citocromo P-450. Los productos formados en estas reacciones son S-conjugados de glutatión. La reacción enzimática es catalizada por las diferentes isoenzimas de la glutatión-S-transferasa.

El glutatión también tiene una gran importancia en la protección de las células contra daño oxidativo producido por los peróxidos. La glutatión peroxidasa (que utiliza como cofactor glutatión reducido, la superóxido dismutasa y la catalasa protegen a los organismos vivos de la acción de intermediarios del oxígeno tales como el anión superóxido (O_2^-), el oxígeno singlete (O_2^*) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Muchos compuestos químicos son convertidos a ácidos mercaptúricos a través de cuatro reacciones enzimáticas. Ellas son: a) conjugación con glutatión para producir conjugados de glutatión, reacción que es catalizada por las glutatión-S-transferasas. b) Remoción del grupo γ -glutamilo del conjugado formado, reacción que es catalizada por la γ -glutamyl-transpeptidasa. c) Remoción del residuo de glicina del S-conjugado de

cistenil-glicina, reacción que es catalizada por varias aminopeptidasas y dipeptidasas. d) N-acetilación del conjugado de cisteína para producir el correspondiente ácido mercaptúrico, reacción que es catalizada por la N-acetiltransferasa.

En este trabajo nos referiremos sólo a dos de estas enzimas: las glutatión-S-transferasas y la γ -glutamyltransferasa.

Glutatión-S-transferasas:

Estas enzimas son un grupo de proteínas que cumplen varias funciones de detoxificación. Así por ejemplo, estas proteínas pueden unirse a compuestos tóxicos de forma similar a como lo hace la albúmina. Este es el caso de la glutatión transferasa B, que primeramente se llamó ligandina precisamente por su alta capacidad para unir un gran número de compuestos lipofílicos.

Debido a la gran afinidad de estas enzimas por compuestos tóxicos y a su alta concentración, ellas pueden actuar como atraparadoras de electrófilos reactivos producidos *in situ* protegiendo de este modo las macromoléculas importantes de la célula. En estas reacciones la enzima es inactivada, vale decir, pierde su capacidad catalítica.

La función catalítica de estas enzimas involucra la formación de un S-conjugado de glutatión (un tioéter) que se produce por reacción entre el glutatión reducido y el compuesto electrofílico. Estas enzimas pueden conjugar glutatión con una gran variedad de compuestos químicos tales como epóxidos y alquil y aril haluros (Jacoby y Habig, 1980).

En los organismos superiores la actividad glutatión transferásica se encuentra mayoritariamente ligada a la fracción citosólica de la célula y puede representar aproximadamente el 5% de la proteína extraíble del hígado. Se han aislado muchas glutatión-S-transferasas distintas de diferentes órganos de una variedad de especies. Todas estas isoenzimas tienen un peso molecular similar, cercano a 50.000 Daltons y están compuestas de dos subunidades.

Como otras enzimas involucradas en procesos de detoxificación, las glutatión-S-transferasas son inducibles por fenobarbital, 3-metilcolantreno, varias drogas y pesticidas.

La glutatión-S-transferasa de *T. cruzi* cataliza *in vivo* e *in vitro* la conjugación de glutatión con óxido de estireno y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (Yawetz y Agosin, 1980, y Tabla 1). La enzima del parásito fue purificada (Yawetz y Agosin, 1981) y se demostró que era una única glutatión-S-transferasa que poseía actividad hacia 1-cloro-2,4-dinitrobenceno y yoduro de metilo.

En hígado de mamífero la glutatión-S-transferasa A cataliza la conjugación de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno y 4-nitro-piridina-N-óxido, mientras que la glutatión-S-transferasa E conjuga preferencialmente yoduro de metilo y compuestos oxiranos (Jacoby y col., 1976). La glutatión-S-transferasa A es eluida de una columna de CM-52 solamente con fuerza iónica alta; sin embargo, la glutatión-S-transferasa E es eluida antes, aplicando un gradiente salino (Habig y col., 1974). El comportamiento de la enzima de *T. cruzi* en comparación con las transferasas A y E antes mencionadas respecto de la especificidad de sustrato, es completamente diferente. Esto fue demostrado por Yawetz y Agosin (1981) y sus resultados apoyan la creciente evidencia que los invertebrados tendrían una sola glutatión-S-transferasa (Motoyama y Dauterman, 1977 y 1978). El peso molecular aparente de 37.000 Daltons encontrado para la enzima de *T. cruzi* es similar a aquellos descritos para la enzima de varias especies de insectos (Usui y col., 1977) y ciertos helmintos parásitos (Douch y Buchanan, 1978). La glutatión-S-transferasa de *T. cruzi* aparentemente corresponde a un heterodímero cuyas subunidades tendrían un peso molecular de 20.000 Daltons una, y de 17.000 Daltons la otra. Resultados similares han sido descritos para la ligandina que aparentemente corresponde a la glutatión-S-transferasa B (Bhargava y col., 1978). A diferencia de la transferasa B, las glutatión-S-transferasas de mamíferos e insectos corresponden a homodímeros (Motoyama y Dauterman, 1978 y Habig y col., 1974).

γ-Glutamiltranspeptidasa:

La síntesis y degradación del glutatión se lleva a cabo en las reacciones del ciclo del γ -glutamilo (Meister, 1981 y 1983). El catabolismo del glutatión es iniciado por la γ -glutamyltranspeptidasa, una enzima que cataliza la transferencia del grupo γ -glutamilo a un aminoácido aceptor para formar γ -glutamyl-aminoácidos. Se ha postulado que la γ -glutamyltranspeptidasa estaría involucrada en el transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares. Esta enzima también cataliza la salida del grupo γ -glutamilo de los glutatión-S-conjugados que es uno de los pasos en la síntesis de los ácidos mercaptúricos (Meister, 1981 y 1983; Tate, 1980). Se ha demostrado que la conjugación de xenobióticos electrofílicos con glutatión es un importante sistema de detoxificación en epimastigotos de *T. cruzi* (Yawetz y Agosin, 1980 y 1981).

La γ -glutamyltranspeptidasa de *T. cruzi* ha sido recientemente estudiada. La enzima del parásito no está asociada a membranas (Repetto y col., 1987); sin embargo, la enzima de mamíferos se encuentra fuertemente

unida a membranas plasmáticas o retículo endoplásmico (Meister, 1984). Estos datos indican la existencia de importantes diferencias entre la enzima de *T. cruzi* y la de mamíferos. Así, la enzima del protozoo es de naturaleza citosólica, es termolábil a temperaturas sobre 30°C, difiere en su especificidad con respecto a los aminoácidos aceptores y en la sensibilidad a inhibidores, especialmente a DON (6-diazo-5-oxo-L-norleucina) y L-azaserina (Repetto y col., 1987). Estas diferencias en especificidad de sustrato y sensibilidad a inhibidores sugiere que los sitios activos de la enzima de *T. cruzi* y de mamíferos son diferentes, observación que puede ser explotada para el diseño de drogas activas contra este parásito (Repetto y col., 1987; Meister, 1983).

CARBOXILESTERASAS

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de ésteres carboxílicos, carboxiamidas y carboxitioésteres. La especificidad de las acciones de las distintas carboxilesterasas depende de la naturaleza de los grupos sustituyentes más bien que de los átomos adyacentes al grupo carboxilo (O, S o N). En la mayoría de los casos, la hidrólisis de un éster o una amida implica destoxicación debido a que se aumenta la hidrofiliidad y por lo tanto la excreción del compuesto. Comúnmente el producto de hidrólisis es conjugado y transformado en un compuesto altamente soluble en agua. Se ha demostrado que las carboxilesterasas están involucradas en la degradación y destoxicación de drogas, insecticidas, herbicidas y antibióticos (Heymann, 1982).

Las estererasas se han clasificado en dos tipos, de acuerdo con su interacción con organofosfatos (Aldridge, 1953; Heymann, 1980). Las estererasas tipo B contienen un residuo de serina en el sitio activo y son fuertemente inhibidas por organofosfatos como el Paraoxón a concentraciones bajo 10^{-6} M. Las estererasas de tipo A no son inhibidas por Paraoxón aun a concentraciones 10^{-3} M, ellas son inhibidas por agentes tioalquilantes como la N-etilmaleimida, lo cual sugiere que estas estererasas podrían tener un grupo-SH en el sitio activo. Ambos tipos de carboxilesterasas están presentes en epimastogotos de *T. cruzi* (Repetto y col., 1983).

Se aceptaba hasta hace poco tiempo que las carboxilesterasas de mamíferos estaban principalmente asociadas con el retículo endoplásmico, a pesar de que habían sido encontradas también asociadas a la fracción citosólica (Atanasov, 1976). Esto se atribuyó a la salida autolítica de las enzimas microsomales hacia la fracción citosólica (Arndt y col., 1973; Heymann y col., 1974; Junge y col., 1974). Sin embargo, Nousiainen y Törrönen (1984) comunicaron que las carboxilesterasas microsomales eran fuertemente inhibidas por Disulfiram y bis-p-nitrofenilfosfato *in*

vivo e *in vitro* y por diisopropilfluorofosfato *in vitro*, mientras que la actividad citosólica era inhibida en una extensión mucho menor por los mismos inhibidores antes mencionados. Estos resultados indican que las actividades carboxilesterásicas microsomal y citosólica son catalizadas por distintas enzimas.

La carboxilesterasa microsomal de epimastigotos de *T. cruzi* es muy sensible a la inhibición por Paraoxón, mientras que la inhibición por N-etilmaleimida, es insignificante (Aldunate y col., 1987). Al contrario, la carboxilesterasa citosólica es más sensible a la inhibición por N-etilmaleimida, mientras que Paraoxón es un débil inhibidor de ella. Estos resultados sugieren que las carboxilesterasas citosólica y microsomal de *T. cruzi* son enzimas diferentes similar a lo que ocurre en hígado de mamífero (Nousiainen y Törrönen, 1984). Más aún, estos resultados podrían indicar que tanto la carboxilesterasa citosólica como la microsomal estarían compuestas de dos poblaciones de enzimas: una que es sensible a la inhibición por N-etilmaleimida y otra que es sensible a la inhibición por Paraoxón.

Las carboxilesterasas de *T. cruzi* son bastante activas (Repetto y col., 1983; Aldunate y col., 1987, y Tabla 1) por lo cual podrían participar en la detoxificación de compuestos tales como el Benznidazol que contiene un grupo carboxiamida.

FOSFATASAS

Estas enzimas pueden remover grupos fosfato de un número importante de compuestos celulares como también de xenobióticos. Las fosfatasas son un importante sistema de detoxificación en insectos (Krueger y Casida, 1961) y mamíferos (Dicowsky y Morello, 1971). Los epimastigotos de *T. cruzi* tienen una fosfatasa ácida lisosomal y dos fosfatasas citosólicas: una ácida y otra alcalina (Letelier y col., 1985a y 1986). Estas enzimas hidrolizan xenobióticos-fosfato (Tabla 1), proteínas fosforiladas y compuestos-fosfatos endógenos (Letelier y col., 1986).

En la Tabla 1 se muestran las actividades de varias enzimas de detoxificación en *T. cruzi*. Los valores representan actividades *in vivo* con excepción de la actividad γ -glutamyltranspeptidásica y por lo tanto ellas representan la capacidad real del *T. cruzi* para convertir drogas a compuestos no tóxicos.

En esta tabla se muestra además, que las dos actividades hidrolíticas mencionadas, las catalizadas por las carboxilesterasas y las fosfatasas son varios órdenes de magnitud mayores que aquellas catalizadas por el sistema oxidativo del citocromo P-450, la glutación-S-transferasa y la

epóxido-hidrasa. Es necesario hacer notar que estas actividades son mucho menores en *T. cruzi* que aquellas encontradas en hígado de mamífero, pero el valor de estas diferencias disminuye si la comparación se hace con valores calculados sobre la base del peso total de los animales.

El sistema de destoxicación de *T. cruzi* puede jugar un papel importante en la insensibilidad del parásito a agentes quimioterapéuticos. Diferentes cepas de *T. cruzi* exhiben distinta susceptibilidad y resistencia a drogas (Brenner y col., 1976; Andrade y col., 1977; Andrade y Figueira, 1977; Andrade, 1985). Estos fenómenos pueden en parte ser explicados o estar correlacionados con posibles diferencias en las enzimas de destoxicación de las distintas cepas del parásito. Moncada (1987) ha demostrado que existen diferencias en la concentración de glutatión y en la actividad glutatión-S-transferásica entre distintas cepas de *T. cruzi*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo recibió ayuda de UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, de CONICYT, FONDECYT-Chile, de la Organización de Estados Americanos (OEA) y de la Universidad de Chile (DIB N° B-1854).

REFERENCIAS

- AGOSIN M. (1983). The aerobic metabolism of metronidazole by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol.* 75C, 311-315.
- AGOSIN M., NAQUIRA C., PAULIN J. and CAPDEVILA J. (1976a). Cytochrome P-450 and drug metabolism in *Trypanosoma cruzi*: effects of phenobarbital. *Science* 194, 195-197.
- AGOSIN M., NAQUIRÁ C., CAPDEVILA J. and PAULIN J. (1976b). Hemoproteins in *Trypanosoma cruzi* with emphasis on microsomal pigments. *Int. J. Biochem.* 7, 585-593.
- AGOSIN M., CHERRY A., PEDEMONTE J. and WHITE R. (1984). Cytochrome P-450 in culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 78C, 127-132.
- ALDRIDGE W.N. (1953). Serum esterases. *Biochem. J.* 53, 117-124.
- ALDUNATE J., REPETTO Y., LETELIER M.E. and MORELLO A. (1987). The carboxylesterases of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol.* 86B, 67-71.
- ANDRADE S.G. (1985). Morphological and Behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18 (Suplemento), 39-46.
- ANDRADE S.G., FIGUEIRA R.M. (1977). Estudo experimental sobre a acao terapeutica da droga Ro 7-1051 na infeccao por diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 19, 335-341.
- ANDRADE S.G., ANDRADE Z.A., FIGUEIRA R.M. (1977). Estudo experimental sobre a resistencia de uma cepa do *Trypanosoma cruzi* ao Bay 2502. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 19, 124-129.
- ARNDT R., HEYMANN E., JUNGE W. and KRISCH K. (1973). Purification and molecular properties of an unspecific carboxylesterase (E₁) from rat liver microsomes. *Eur. J. Biochem.* 36, 120-128.
- ATANASOV N. (1976). Purification and molecular weight of human liver carboxylesterases (EC 3.1.1.1). *Rev. Roum. Biochim.* 13, 179-184.
- BHARGAVA M.M., LISTOWSKY I. and ARIAS I.M. (1978). Studies on subunit structure and evidence that ligandin is a heterodimer. *J. Biol. Chem.* 253, 4116-4119.
- BRENER Z., COSTA C.A.G. and CHIARI C. (1976). Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 18(6), 450-455.
- CALDWELL J. (1976). The metabolism of amphetamines in mammals. *Drug Metab. Rev.* 4, 219-280.
- COON M.J. and PERSSON A.V. (1980). Microsomal Cytochrome P-450: A Central Catalyst in Detoxication Reactions. In *Enzymatic Basis of Detoxication* (Edited by W.B. Jakoby), Vol. 1, pp. 117-134. Academic Press. New York.
- DEBOISO J.F. and STOPPANI A.O.M. (1971). Microsomal hemoproteins in *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 136, 215-221.

- DICOWSKY L. and MORELLO A. (1971). Glutathione-dependent degradation of 2,2-dichlorovinyl phosphate (DDVP) by the rat. *Life Sci.* 10, 1031-1037.
- DIXON P.A.F., CALDWELL J. and SMITH R.L. (1977). Studies on the metabolism of arylacetic acids. The metabolic fate of diphenylacetic acid and its variations with species and dose. *Xenobiotica.* 7, 717-726.
- DOUCH P.G.C. and BUCHANAN L.L. (1978). Glutathione conjugation of some xenobiotics by *Ascaris suum* and *Moniczia expansa*. *Xenobiotica* 8, 171-176.
- FUJITA T., SHOEMAN D.W. and MANNERING G.J. (1973). Differences in P-450 cytochromes from livers of rats linked with phenobarbital and with 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.* 248, 2192-2201.
- HABIG W.H., PABST M.J. and JAKOBY W.B. (1974). Glutathione-S-transferases. The first enzymic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- HEYMANN E. (1980). Carboxylesterases and Amidases. In *Enzymatic Basis of Detoxication* (Edited by Jakoby W.B.), Vol. 2, pp. 291-323. Academic Press, New York.
- HEYMANN E. (1982). Hydrolysis of carboxylic esters and amides. In *Metabolic Basis of Detoxication*. (Edited by Jakoby W., Rend J. and Caldwell J.), pp. 229-245. Academic Press. New York.
- HEYMANN E., JUNGE W., KRISCH K. and MARCUSSEN-WOLFF G. (1974). Simple and rapid methods for the preparation highly purified carboxylesterases (EC 3.1.1.1.) from porcine and bovine liver and porcine kidneys. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 355, 155-163.
- JAKOBY W.B. (1980). Detoxication enzymes. In *Enzymatic basis of detoxication* (edited by W.B. Jakoby). Vol. 1, pp. 1-6. Academic Press. New York.
- JAKOBY W.B. and HABIG W.H. (1980). Glutathione transferases. In *Enzymatic Basis of Detoxication* (Edited by Jakoby W.B.) Vol. 2, pp. 63-94. Academic Press. New York.
- JAKOBY W.B., HABIG W.H., KEEN J.H., KETLEY J.N. and PABST M.J. (1976). In *Glutathione: Metabolism and Function* (Edited by Arias I.M. and Jakoby W.B.), pp. 189-211. Raven Press, New York.
- JUNGE W., HEYMANN E., KRISCH K. and HOLLANDT H. (1974). Human liver carboxylesterase. Purification and molecular properties. *Archs. Biochem. Biophys.* 165, 749-763.
- KRUEGER H.R. and CASIDA J.E. (1961). Hydrolysis of certain organophosphate insecticides by housefly enzymes. *J. econ. Entomol.* 54, 239-247.
- LETELIER M.E., SÁNCHEZ E. and DEL VILLAR E. (1984). Enhanced metabolism of morphine in *Octodon degus* compared to Wistar rats. *Gen. Pharmac.* 15(5), 403-406.
- LETELIER M.E., DEL VILLAR E. and SÁNCHEZ E. (1985). Drug Tolerance and detoxicating enzymes in *Octodon degus* and Wistar rats. A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol.* 80C, 195-198.
- LETELIER M.E., REPETTO Y., ALDUNATE J. and MORELLO A. (1985a). Acid and alkaline phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol.* 81B, 47-51.

- LETELIER M.E., ALLIENDE C., GONZÁLEZ J., ALDUNATE J., REPETTO Y. and MORELLO A., (1986). Phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi*. Phosphate removal from ATP, phosphorylated proteins and other phosphate compounds. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B, 375-380.
- LU A.Y.H., JUNK K.W. and COON M.J. (1969). Resolution of the cytochrome P-450 containing W-hydroxylation system of liver microsomes into three components. *J. Biol. Chem.* 244, 3714-3721.
- MALANGA C.M., CONROY J. and CUCKLER A.C. (1981). Therapeutic efficacy of several nitroimidazoles for experimental *Trypanosoma cruzi* infections in mice. *J. Parasitol.* 67, 35-40.
- MEISTER A. (1981). Metabolism and functions of glutathione. *TIBS* 6, 231-234.
- MEISTER A. (1983). Metabolism and transport of glutathione and other Y-glutamyl compounds. In *Functions of Glutathione* (Edited by Larsson A., Orrenius S., Holmgren A. and Mannervik B.). pp. 1-22. Raven Press, New York.
- MEISTER A. (1984). Selective Modification of Glutathione Metabolism. *Science* 220, 445-447.
- MONCADA C. (1987). Thesis. Gamma glutamyltranspeptidasa, glutatión S-transferasa y contenido de glutatión en diversas cepas de *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- MOTOYAMA N. and DAUTERMAN W.C. (1977). Genetic studies on glutathione-dependent reactions in resistant strains of the house fly. *Musca domestica* L. *Pestic. Biochem. Physiol.* 7, 443-450.
- MOTOYAMA N. and DAUTERMAN W.C. (1978). Molecular weight, subunits, and multiple forms of glutathione S-transferase from the house fly. *Insect Biochem.* 8, 337-348.
- MULLER M. (1981). Action of clinically utilized 5-nitroimidazoles on microorganisms. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 26, 31-41.
- NOUSIAINEN V. and TÖRRÖNEN R. (1984). Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in the rat liver by *in vivo* and *in vitro* inhibition. *Gen. Pharmac.* 15, 223-227.
- OESCH F. (1973). Mammalian epoxide hydrazase: Inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds. *Xenobiotica* 3, 305-340.
- OESCH F. (1980). Microsomal Epoxide Hydrolase. In *Enzymatic Basis of Detoxication* (Edited by W.B. Jakoby) Vol. 2, pp. 277-290. Academic Press. New York.
- OESCH F., KAUBISH N., JERINA D.M. and DALY J. (1971). Hepatic epoxide hydratase: structure-activity relationships for substrates and inhibitors. *Biochemistry* 10, 4858-4866.
- REPETTO Y., Aldunate J. and MORELLO A. (1983). *Trypanosoma cruzi*: Carboxylesterase activity in intact epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol.* 76B, 61-64.

- REPETTO Y., LETELIER M.E., ALDUNATE J. and MORELLO A. (1987). The Y-glutamyltranspeptidase of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B, 73-78.
- SCHOFIELD C.J. (1985). Control of Chagas' disease vectors. *British Med. Bull.* 41(2). 187-194.
- TATE S.S. (1980). Enzymes of mercapturic acid formation. In *Enzymatic basis of detoxication* (Edited by Jakoby W.B.). Vol. 2, pp. 95-120. Academic Press, New York.
- USUI K., FUKAMI J. and SHISHIDO T. (1977). Insect glutathione S-transferase: Separation of transferases from fat bodies of American cockroaches active on Organophosphorus Triesters. *Pestic. Biochem. Physiol.* 7, 249-260.
- YAWETZ A. and AGOSIN M. (1979). Epoxide hydrase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem. Biophys. Acta* 585, 210-219.
- YAWETZ A. and AGOSIN M. (1980). Glutathione -S-transferase and drug metabolism in *Trypanosoma cruzi*: *in vivo* and *in vitro* formation of thioethers. *Comp. Biochem. Physiol.* 66C, 265-267.
- YAWETZ A. and AGOSIN M. (1981). Purification of the glutathione S-transferase of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68B, 237-243.