

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LA ACCION DE DOS DERIVADOS BENZO (de) ISOQUINOLIL-1,3-DIONA SOBRE TRYPANOSOMA CRUZI "IN VITRO"

A. OSUNA (1), S. CASTANYS (1), G. ORTEGA (1), F. GAMARRO (1), J. ANEIROS (2),
M. F. BRAÑA (3) y C. M. ROLDAN (3)

RESUMEN

Fueron analizadas las alteraciones a nivel ultraestructural, producidas por dos derivados benzo (de) isoquinolil-1,3-diona, en formas de cultivo de *Trypanosoma cruzi*. Estos compuestos, M-12210 y FA-142, son drogas intercalantes del DNA que tienen una gran afinidad por éste. El DNA del kinetoplasto pierde su estructura regular de doble hilera, produciéndose arqueamientos, la cromatina aparece irregularmente condensada en los núcleos, en el citoplasma se observa gran cantidad de inclusiones lipídicas y vacuolas.

INTRODUCCION

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, dolencia que afecta a un número elevado de personas en el Continente Americano y de la que actualmente se carece de una terapia eficaz.

Diversos Autores han probado la acción de agentes intercalantes del DNA sobre las formas de cultivo de este protozoo, estudiando los porcentajes de inhibición del crecimiento así como las alteraciones producidas tanto en el kinetoplasto como en el núcleo. DELAIN & col.⁶, estudiando la acción de dos intercalantes del DNA, Bromuro de Etidio y Daunomicina, observaron al microscopio electrónico que estas drogas, a baja concentración y corto periodo de tiempo de incubación, producen una substancial alteración del kinetoplasto. BÉNARD & RIOU² obtuvieron resultados similares cuando sometieron al parásito a bajas dosis de intercalantes derivados de la Elíptica, mostrando la pérdida progresiva del kinetoplasto y alteraciones en el núcleo. SIMS & GUTTERIDGE¹³ demostraron que un derivado 5-nitrofurán, la

droga SQ 18.506, probable agente alquilante del DNA, produce una gran vacuolización del citoplasma de las formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Nosotros en el presente trabajo, estudiamos las alteraciones que a nivel ultraestructural producen las drogas M-12210 (5-nitro-2-(2-(1-pirrolidin)-etil)-benzo (de) isoquinolil-1,3-diona), y FA-142 (5-amino-2-(2-dimetilaminoetil)-benzo (de) isoquinolil-1,3-diona), derivados sintetizados por ROLDAN & col.¹², BRAÑA & col.³ describen la acción citostática de esta nueva serie, GARCÍA-GANCEDO & col.¹⁰ estudian la actividad antiviral de estos compuestos y BRAÑA & col.⁴ ensayan estos agentes en células cancerosas, sugiriendo que bloquean la síntesis de DNA y RNA debido probablemente a la alta afinidad e intercalación en la doble hélice del DNA.

Estas drogas fueron sometidas a un estudio previo por ADROHER & col.¹ y por OSUNA & col.¹¹, donde se comprobaron las altas tasas de inhibición del crecimiento que inducen en las formas epimastigotas de *T. cruzi*.

(1) Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia.

Granada, España

(2) Departamento de Anatomía Patológica. Facultad de

Medicina. Granada, España

(3) Laboratorios MADE. Apartado 535. Madrid, España

MATERIAL Y METODOS

Las formas flageladas de *T. cruzi* procedentes de un caso clínico en Venezuela, cedidas a nuestro laboratorio por el Instituto de Malariología de Caracas, fueron cultivadas en medio LIT (CAMARGO⁵), a 28°C durante 72 h. Los cultivos en fase logarítmica de crecimiento fueron centrifugados a 2.500 g durante 5 min. y posteriormente se transfirió el botón a medio fresco conteniendo las drogas. El número de formas flageladas fué de 3×10^5 /ml y la concentración de ambas drogas de 1 µg/ml. El lote control y los dos tratados se incubaron a 28°C durante 48 h, transcurrido este tiempo, fueron centrifugados los cultivos y lavados sucesivas veces con solución tamponada PBS. El botón, finalmente obtenido, fué procesado para microscopía electrónica como describen DELAIN & RIOU⁷.

RESULTADOS

De la comparación a nivel ultraestructural entre las formas de cultivo de *T. cruzi*^{7,8,9} y las tratadas con las drogas M-12210 y FA 142, se pueden observar, estudiando las Figuras (de la 3 a la 7), las siguientes alteraciones: a) El núcleo por lo general, presenta la heterocromatina dispuesta laxamente, no apreciándose alteraciones en el endosoma. b) El citoplasma contiene acúmulos de vacuolas autofágicas y gotas lipídicas en número excesivo con respecto a los controles. c) En algunas formas, las alteraciones en el kinetoplasto llegan a presentar su DNA sin su estructura típica de doble hilera, mostrando estructuras arqueadas y un aspecto altamente electrodenso, fenómeno no observado en los controles.

DISCUSION

De los resultados obtenidos, se sugiere que ambas drogas poseen una acción intercalante sobre el DNA, como demostraron estudios precedentes en células cancerosas⁴. Los efectos ob-

servados por nosotros a nivel del núcleo y del kinetoplasto cuando se trataron los flagelados con los intercalantes, indican que su principal modo de acción sobre *T. cruzi* se debe a su conocida unión en el DNA, debiendo interferir tanto la replicación como la trascripción, explicando así los acúmulos irregulares de la cromatina o la distribución laxa de la misma en los núcleos de los protozoos tratados.

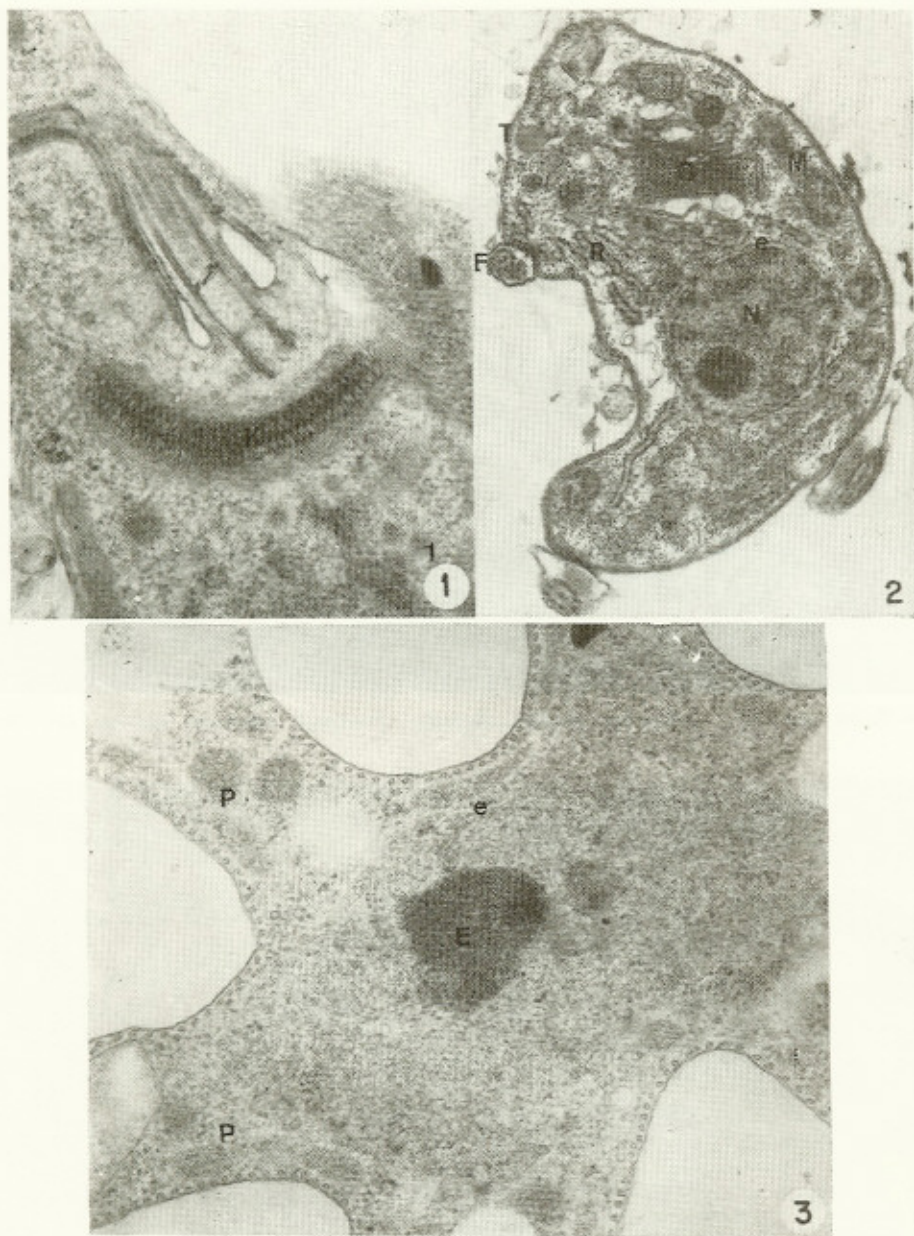
La presencia de grandes vacuolas e inclusiones lipídicas concuerdan con los resultados obtenidos por otros Autores con la droga SQ 18.506, que al parecer reacciona como un agente alquilante con el DNA, inhibiendo la síntesis de RNA y por tanto de proteínas¹³.

Los acúmulos lipídicos quizás provengan de la inhibición del metabolismo mitocondrial con las consecuentes alteraciones citoplasmáticas.

La presencia de flagelados con prolongaciones citoplasmáticas quizás corresponda a la acción de la droga sobre el metabolismo general del protozoo y que por algun mecanismo, produzca la relajación de los túbulos periféricos.

Las alteraciones producidas por el M12210 a nivel del DNA del kinetoplasto son semejantes a las observadas por BÉNARD & RIOU² y DELAIN & col.⁶ cuando tratan los flagelados con Ellipticina o Bromuro de Etidio y Daunomicina, respectivamente, drogas todas ellas de reconocida acción intercalante. En estos casos los Autores encuentran al igual que nosotros una pérdida de la estructura normal de la doble hilera del kDNA, volviéndose éste muy electrodenso induciéndose un reagrupamiento del kDNA en estructuras arqueadas típicas. Estas estructuras como sugieren DELAIN & col.⁶, podrían deberse a una torsión de la doble hélice quedando modificada la estructura terciaria.

En conclusión estos dos nuevos intercalantes del DNA podrían ser subceptibles de ser utilizados en la quimioterapia de la enfermedad de Chagas.



Ultraestructura de las formas de cultivo de *T. cruzi* tratadas con 1 μ g/ml de las drogas M-12210 y FA-142, 48 h postinoculación.

Fig. 1 — Estructura típica del kinetoplasto (K) en una forma epimastigota no tratada. (40.000 \times).
Fig. 2 — Forma tripomastigota no tratada originada en el cultivo en la que se observa el núcleo (N) con envoltura (e) y microporos, disposición normal de la cromatina, retículo endoplasmático rugoso (R), aparato de Golgi (G), mitocondria (M), tres secciones del flagelo (F) con la cuerda paraxial y axonema microtubular y túbulos periféricos (T) (20.000 \times).
Fig. 3 — Forma epimastigota tratada con M-12210 en la que destaca el endosoma central (E) condensado y la cromatina laxamente distribuida, envoltura nuclear (e) y numerosas prolongaciones citoplasmáticas (P) (50.000 \times).

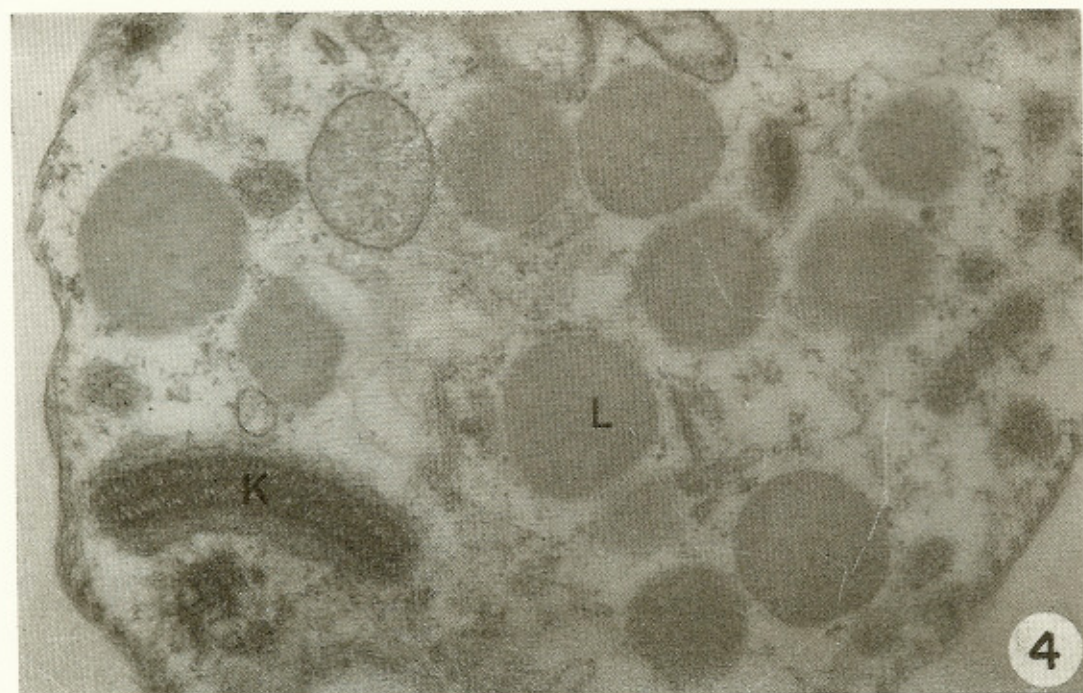


Fig. 4 — Forma epimastigota tratada con M-12210 mostrando numerosas inclusiones lipídicas (L) (30.000 X)

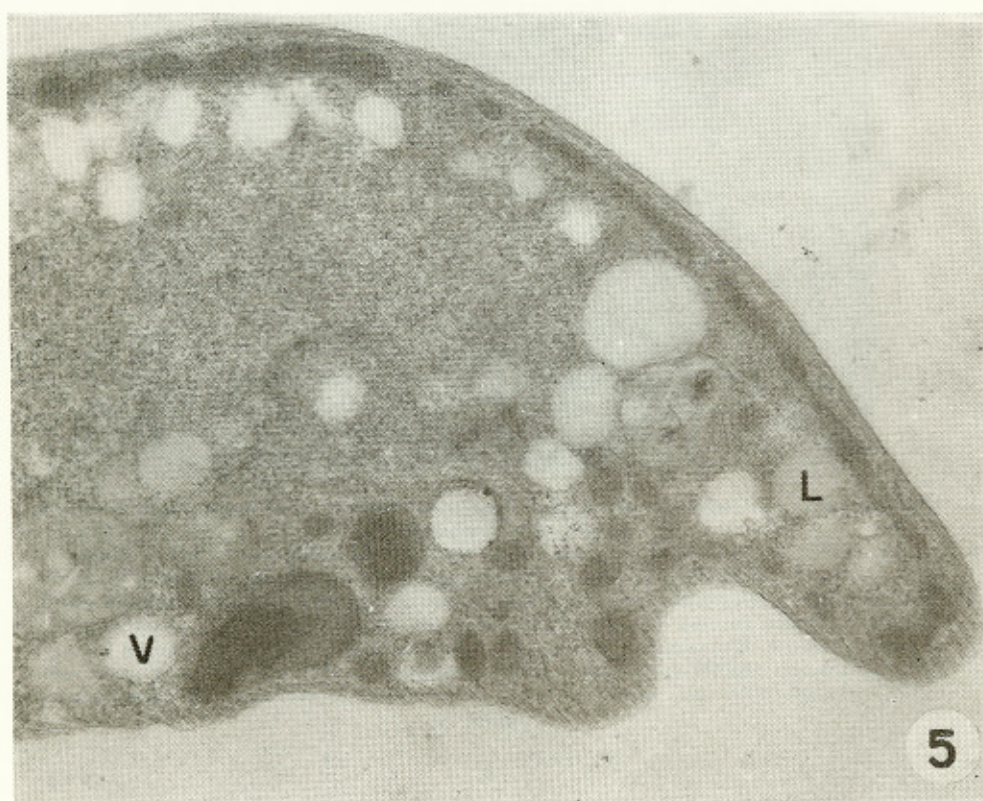


Fig. 5 — Forma tratada con M-12210 en la que se observan numerosas vacuolas (V) y gotas lipídicas (L) (30.000 X)

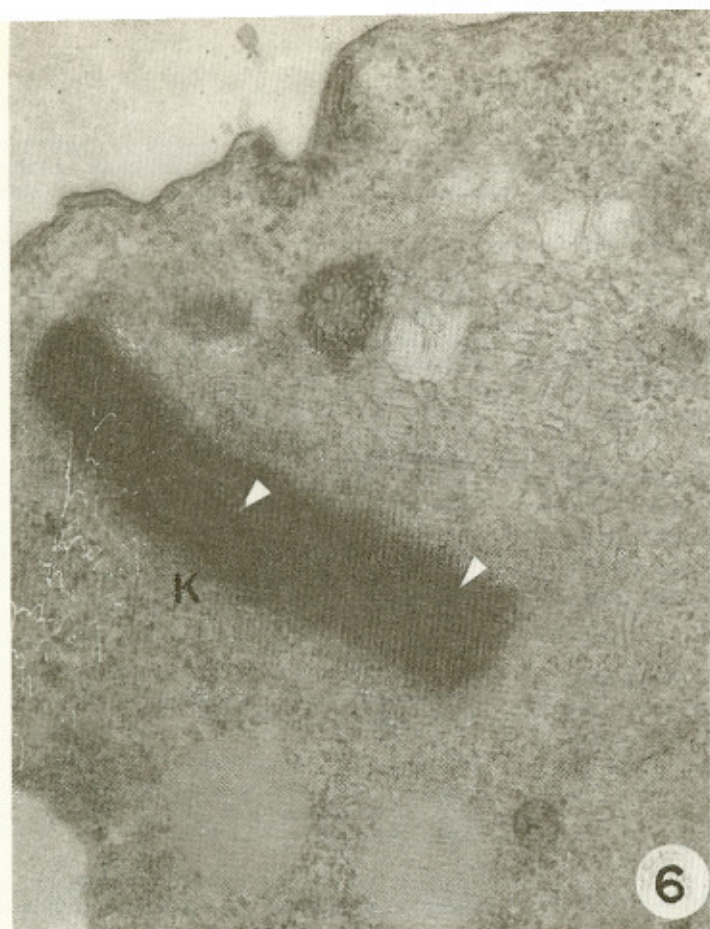


Fig. 6 — Tras el tratamiento con M-12210, el DNA del kinetoplasto (K) aparece muy electrodensó y presenta estructuras arqueadas (flechas blancas) (50.000 X)



Fig. 7 — Epimastigote tratado con la droga FA-142, núcleo (N) con la cromatina irregularmente repartida, fase de división con dos flagelos (F), kinetoplasto (K) normal y acúmulos de gotas lipídicas (L) (40.000 X)

SUMMARY

Ultrastructural studies of the action of two benzo (de) isoquinoline-1,3-diones derivatives against *Trypanosoma cruzi* culture forms.

We tested the ultrastructural alterations generated by two benzo (de)-isoquinoline 1,3 diones derivatives on *Trypanosoma cruzi* culture forms. These compounds, M-12210 and FA-142, are DNA intercalating drugs with a high affinity for DNA.

The regular double row of kDNA disappeared forming characteristic arched structures, the cromatin was irregularly condensed in the nucleus, the cytoplasm contained many lipid inclusions and vacuoles.

REFERENCIAS

1. ADROHER, F. J.; ORTEGA, G.; OSUNA, A.; BRAÑA, M. F. & ROLDAN, C. M. — Anti *Trypanosoma cruzi* action of two benzo (de) isoquinoline-1,3-diones. "ND Mediterranean Congress of Chemotherapy, Nice, Abst. 436, p. 294, 1980.
2. BENARD, J. & RIOU, G. — Biochemical action of ellipticine derivatives on *Trypanosoma cruzi*. In: *Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships*. (H. van den Bossche, ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1976, pp. 477-484.
3. BRAÑA, M. F.; CASTELLANO, J. M.; JIMENEZ, A.; LLOMBART, A.; RABADAN, F. P.; ROLDAN, C. M.; ROLDAN, C.; SANTOS, A. & VAZQUEZ, D. — Synthesis, cytostatic activity and mode of action of a new series of imidine derivatives of 3-nitro-1,8-naphthalic acid. 10th International Congress of Chemotherapy, Zurich, 1977.
4. BRAÑA, M. F.; CASTELLANO, J. M.; ROLDAN, C. M.; SANTOS, A.; VAZQUEZ, D. & JIMENEZ, A. — Synthesis and mode(s) of action of a new series of imide derivatives of 3-nitro-1,8-naphthalic acid. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 4: 61-66, 1980.
5. CAMARGO, E. P. — Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 6: 93-100, 1964.
6. DELAIN, E.; BRACK, CH.; LACOME, A. & RIOU, G. — Organization of the DNA in the kinetoplast of trypanosomatidae. In: *Comparative Biochemistry of Parasites*. (H. van den Bossche, ed.). New York, Academic Press, 1972, pp. 1677-1687.
7. DELAIN, E. & RIOU, G. — Ultrastructure du DNA du kinetoplaste de *Trypanosoma cruzi* cultivé in vitro. *C. R. Acad. Sc. Paris Série D*, 268: 1225-1227, 1969.
8. DE SOUZA, W. & CHIARI, E. — Fine structure of the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* isolated from acellular culture by passage in column. *Rev. Brasil. Biol.* 37: 671-675, 1977.
9. DE SOUZA, W.; GRYNBERG, N. & NERY-GUIMARAES, F. — Aspectos ultraestruturais da forma cpimastigota do *Trypanosoma cruzi* em meio LIT. *Rev. Soc. Brasil. Med. trop.* 9: 143-156, 1975.
10. GARCIA-GANCEDO, C.; GIL, C.; ROLDAN, C. M.; PEREZ, S. & VILAS, P. — Antiviral action of benzo(de) isoquinoline-1,3-diones derivatives. *Chemotherapy* 25: 83-90, 1979.
11. OSUNA, A.; CASTANYS, S.; MASCARO, C.; ADROHER, F. J.; BRAÑA, M. F. & ROLDAN, C. M. — In vitro action of three benzo(de) isoquinoline-1,3-diones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* (enviado para publicación).
12. ROLDAN, C. M.; BRAÑA, M. F. & CASTELLANO, J. M. — Un procedimiento para la preparación industrial de naftalimidias sustituidas en el nitrógeno y en la posición tres, y sus derivados. *Spain Pat. n.º* 410740, 1973.
13. SIMS, P. & GUTTERIDGE, W. E. — Biochemical effects and mode of action of a 5-nitrofurán drug, SQ 18.506, on *Trypanosoma cruzi*. In: *Biochemistry of Parasites and Host-Parasites Relationships*. (H. van den Bossche, ed.). Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1976, pp. 485-491.

Recebido para publicação em 27/5/1982.