

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Muerte celular	2
1.2.1. <i>Apoptosis</i>	2
1.2.1.1. <i>Fase de decisión</i>	4
1.2.1.2. <i>Fase de compromiso</i>	5
1.2.1.3. <i>Fase de ejecución</i>	6
1.2.1.4. <i>Apoptosis en protozoarios</i>	8
1.2.1.5. <i>Métodos para estudio de apoptosis</i>	8
1.2.2. <i>Autofagia</i>	9
1.2.2.1. <i>Autofagia como estrategia terapéutica</i>	10
1.2.2.2. <i>Métodos para estudio de autofagia</i>	10
1.2.3. <i>Necrosis</i>	10
1.2.3.1. <i>Métodos para estudio de necrosis</i>	10
1.2.3.2. <i>Necrosis programada</i>	11
1.3. <i>Uso de RMN para estudios del tipo de muerte celular</i>	11
1.4. <i>Metabolismo energético de los tripanosomatídeos</i>	14
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	19
2.1. <i>I+D de nuevos fármacos antichagásicos</i>	19
2.2. <i>Objetivos generales</i>	21
2.3. <i>Objetivos específicos</i>	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. <i>Consideraciones generales</i>	22
3.2. <i>Estudio del tipo de muerte celular</i>	23
3.2.1. <i>Ensayo de microscopia óptica</i>	23
3.2.2. <i>Ensayo de TUNEL y tinción con IP</i>	23
3.2.3. <i>Ensayo de hemólisis</i>	23
3.2.4. <i>Identificación del tipo de muerte celular en T. cruzi por ¹H-RMN</i>	24
3.2.4.1. <i>Induciendo apoptosis con H₂O₂</i>	24
3.2.4.2. <i>Induciendo apoptosis en la fase estacionaria de crecimiento</i>	24
3.2.4.3. <i>Induciendo necrosis por Nfx y Qdo2</i>	25
3.2.5. <i>Análisis ultraestructural (MET)</i>	25
3.2.6. <i>Estudios con inhibidor del proceso de autofagia: 3-MA</i>	26
3.3. <i>Estudio del mecanismo de acción</i>	26
3.3.1. <i>Determinación del cambio metabólico en T. cruzi utilizando ¹H-RMN</i>	26
3.3.2. <i>Determinación de la actividad inhibitoria de enzimas deshidrogenasas mitocondriales</i>	27

4. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA	28
5. ESTUDIOS DEL TIPO DE MUERTE	30
5.1. Estudios de microscopia óptica como aproximación al análisis del tipo de muerte del parásito tratado con los compuestos en estudio	30
5.2. Confirmación del tipo de muerte celular por las técnicas de TUNEL y tinción con IP	36
5.3. Estudio de la interacción de los compuestos con la membrana del eritrocito	40
5.4. Identificación del tipo de muerte celular en <i>T. cruzi</i> por ¹ H-RMN	41
5.4.1. <i>Induciendo apoptosis con H₂O₂</i>	43
5.4.2. <i>Induciendo apoptosis por envejecimiento del cultivo de parásitos en medio axénico</i>	46
5.4.3. <i>Induciendo necrosis por Nfx y Qdo2</i>	48
5.5. Análisis ultraestructural (MET)	50
5.6. Estudios con inhibidor del proceso de autofagia: 3-MA	56
6. ESTUDIOS DEL MECANISMO DE ACCIÓN	57
6.1. Determinación del cambio metabólico en <i>T. cruzi</i> por ¹ H-RMN	57
6.2. Determinación de la actividad inhibitoria de enzimas deshidrogenasas mitocondriales	66
7. CONCLUSIONES	68
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69