

309027

2



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA  
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

EVALUACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE  
TRYPANOSOMA CRUZI A DOS FARMACOS:  
RADANIL Y LAMPIT

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**MARIA CAROLINA ANGELES BONFIL**

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1995

FALLA AP DE INARINON



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

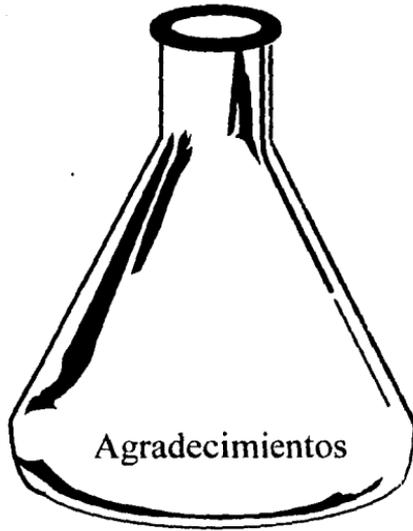
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**Este trabajo se realizó en Laboratorio de Entomología del Departamento de Parasitología en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N.**

**Director de Tesis: Dr. en C. Benjamín Noguera Torres**



Agradecimientos

**A Dios, mi mejor maestro y amigo**

**A el profesor Benjamín Nogueta Torres por su apoyo,  
sus enseñanzas y valiosos consejos**

**A todos mis profesores, particularmente a:  
Q.F.B. Angélica López Sotelo  
Q.F.B. Graciela Sosa  
M. en C. Ricardo Alejandro Aguilar**

**A mis padres, por su ejemplo, estímulo y paciencia**

**A mis hermanas Marta y Liz, porque siempre estuvieron  
dispuestas a ayudarme**

**A el Ingeniero Francisco José Roig L., por su incondicional ayuda, confianza  
y por compartir conmigo su experiencia y madurez**

**A todas mis compañeras, especialmente a mis amigas: Vero, Ana María, Luz María,  
Silvia y Karina**

## INDICE

Capítulo I	INTRODUCCIÓN	
1.1.	Planteamiento del problema	2
1.2.	Objetivos	4
1.3.	Hipótesis	5
Capítulo II	ANTECEDENTES	
2.1.	<i>Trypanosoma cruzi</i>	7
2.2.	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
2.3.	Modo de acción de los fármacos probados	16
2.4.	Trabajos previos sobre la susceptibilidad a fármacos	19
Capítulo III	PARTE EXPERIMENTAL	
3.1.	Diagrama general	22
3.2.	Material, reactivos y equipos	23
3.2.1.	Material biológico	
3.2.2.	Material de laboratorio	
3.2.3.	Reactivos	
3.2.4.	Equipo	
3.3.	Metodología	25
3.3.1.	Métodos	
Capítulo IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1.	Resultados	32
4.2.	Discusión	40
Capítulo V	CONCLUSIÓN	
5.1	Conclusión	44
BIBLIOGRAFÍA		45

## CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Planteamiento del problema

#### 1.1.1 La enfermedad de Chagas

La infección de seres humanos por *Trypanosoma cruzi* provoca la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana (25). *T. cruzi* es transmitido en condiciones naturales por artrópodos estrictamente hematófagos pertenecientes a la subfamilia triatominae (*insecta: reduviidae*) (10).

La importancia de la enfermedad de Chagas radica:

a) Su amplia distribución geográfica: desde el sur de Estados Unidos de Norteamérica hasta aproximadamente el paralelo 41 de latitud sur en Chile y Argentina (25).

b) Su alta morbilidad: se calcula que existen al rededor de 24 millones de personas infectadas. Es, después de la malaria, la enfermedad transmitida por artrópodos más frecuente en América latina, y

c) Hasta el momento no hay medidas de control para este padecimiento ya que no existen vacunas; el control de los transmisores a través de insecticidas es tan costoso que lo hace inoperante para gobiernos siempre en crisis, y la quimioterapia es aún inadecuada, ya que los fármacos de elección presentan una alta incidencia de efectos colaterales y además de que no está claro si estos fármacos producen la cura parasitológica (10,37).

En México el padecimiento es endémico y existen localidades en que se propone que se considere a la enfermedad de Chagas un problema de salud pública (34).

La enfermedad de Chagas presenta tres fases o formas clínicas: 1) enfermedad aguda, que se presenta en el 5% de los sujetos infectados; 2) fase latente, y 3) enfermedad crónica, que se hace aparente en el 30-40% de los casos (10).

#### 1) Enfermedad aguda:

Comprende la primoinfección parasitaria, se caracteriza por un periodo de parasitemia patente, su duración varía de 1 a 2 meses y se caracteriza clínicamente por signos en la puerta de entrada del parásito (chagoma de inoculación, signo de Romana), por fiebre, edema, aumento del tamaño de los ganglios linfáticos y una miocarditis severa, al menos en sus fases iniciales, acompañada de la presencia de parásitos dentro de las fibras cardíacas (25).

En la mayoría de los casos los signos y síntomas desaparecen espontáneamente y son seguidos por una aparente recuperación de la miocarditis. En pacientes que no han estado bajo quimioterapia la mortalidad es del 2 al 8%, principalmente en niños.

#### 2) Fase latente:

También llamada indeterminada ya que su duración es por períodos largos e incluso toda la vida. Se presenta en la mayoría de los casos (50-60%), aparentemente no existen síntomas y la serología es positiva por lo que el diagnóstico en esta etapa de la enfermedad es casual (25).

#### 3) Fase crónica:

Alrededor del 20-30% de los casos desarrollan dentro de los 10 a 20 años de la infección una miocardiopatía de severidad variable (cardiomegalia); finalmente, 8 a 10% presentan una forma digestiva de la enfermedad, caracterizada por dilataciones patológicas de algunas regiones del intestino como resultado de la deservación de células ganglionares del plexo mientérico parasimpático, lo que conduce a la reducción del peristaltismo y acumulación del contenido. Cierta porcentaje de pacientes presentan una asociación de manifestaciones cardíacas y digestivas. Se desconoce el porqué los pacientes chagásicos pueden desarrollar diferentes formas clínicas (25).

### 1.1.2 Quimioterapia de la enfermedad de Chagas

Después del descubrimiento de la enfermedad de Chagas en 1909, y hasta 1937, no había sido probado en humanos ningún compuesto químico contra esta enfermedad. A partir de este año se inició la búsqueda de fármacos con actividad contra *T. cruzi* por diversas industrias farmacéuticas.

La mayoría de los fármacos evaluados clínicamente mostraron poca actividad en la eliminación de parásitos a excepción de los derivados 5-Nitrofuranos (Nifurtimox o Lampit) y 2-Nitroimidazoles (Benznidazol o Radanil)

Sin embargo, la quimioterapia de esta enfermedad es aún inadecuada, ya que las drogas de elección (Nifurtimox y Benznidazol) son parcialmente efectivas en el tratamiento de la enfermedad aguda y son ineficaces en el tratamiento de la fase crónica de la enfermedad (37) y se han descrito cepas del parásito resistentes a ambos fármacos (9).

Además pacientes tratados con estos fármacos presentan severos efectos colaterales tales como anorexia, urticaria, neuritis periférica y psicosis. Se duda que éstos medicamentos sean capaces de realizar una cura parasitaria (26).

Por lo tanto, es importante incrementar el número de investigaciones tendientes al desarrollo de nuevos compuestos o bien mejorar los existentes con el fin de lograr resultados más satisfactorios.

Debido a que no ha sido posible descubrir nuevos compuestos gufas a través de síntesis al azar o por programas de ensayo de la actividad de numerosos fármacos, los investigadores se han concretado a programas mas racionales de desarrollo de nuevos fármacos.

Basándose en estudios sobre la bioquímica y biología molecular de los tripanosomas, se han buscado diferencias marcadas entre el parásito y el hospedero que pudieran ser explotadas como blancos para el desarrollo de nuevas drogas (37).

## 1.2 Objetivos

### Objetivo General:

Observar la susceptibilidad y/o resistencia de dos clones de *Trypanosoma cruzi* al Radanil y Lampit.

### Objetivos Particulares:

1. Evaluar la actividad tripanomicida *in vitro* del Radanil y Lampit para las clones CID-1 y MIGUZ-1 de *T. cruzi*.
2. Evaluar la actividad tripanomicida *in vivo* del Radanil y Lampit para las clones CID-1 y MIGUZ-1 de *T. cruzi*.
3. Comparar la correlación entre las pruebas *in vitro* e *in vivo* de evaluación de fármacos.

### **1.3 Hipótesis de trabajo:**

La existencia de heterogeneidad en las poblaciones de *T. cruzi* se manifiesta por diferencias en la sensibilidad a fármacos. Si las clonas CID-1 y MIGUZ-1 son diferentes entre sí, entonces presentarán sensibilidad diferente a los fármacos de prueba.

## CAPITULO II

## ANTECEDENTES

### 2.1 *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* es un parásito protozoario que pertenece al phylum Sarcomastigophora, es miembro de la familia Tripanosomatidae en donde se encuentran también ubicados parásitos como los tripanosomas africanos que causan la llamada "Enfermedad del sueño" en el hombre, además de otras especies de gran importancia veterinaria, y las diferentes especies del género *Leishmania* que afectan gran parte del mundo. Según la W.H.O. (36,37) los tripanosomátidos ocupan, dentro de las diez enfermedades parasitarias más importantes del mundo, el quinto puesto.

*T. cruzi* se presenta en la naturaleza en tres formas morfológicamente distintas, definidas por a) La forma general de la célula, b) La posición del cinetoplasto (organelo intramitocondrial con alto contenido de DNA) y c) La región en donde emerge el flagelo a partir de la bolsa flagelar (22). Las fases son:

1. Amastigote: Son de forma esférica u ovalada de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, presentan cinetoplasto, gránulo basal, flagelo reducido a una corta porción del axonema que tiene un recorrido intraprotoplásmico, sin atravesar las membranas. Representa una forma de multiplicación que se encuentra intracelularmente en los mamíferos huéspedes (25).

2. Epimastigote: Tienen el cinetoplasto situado en posición anterior, cercana al núcleo; un flagelo y una membrana ondulante corta; son organismos fusiformes de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de longitud y representan una forma de multiplicación que se encuentran en el tubo digestivo del transmisor, en medios de cultivo y durante la diferenciación de amastigote a tripomastigote dentro de la célula (25).

3. Tripomastigotes: Existen dos tipos, dependiendo del huésped en donde se localicen:

i) Tripomastigotes metacíclicos: Tienen el cinetoplasto situado detrás del núcleo y un flagelo, así como una membrana ondulante a lo largo del organismo, su longitud aproximada es de 16 a 20  $\mu\text{m}$ , representan la forma infectiva. Se encuentran en el intestino posterior de los triatomos (25).

ii) *Tripomastigotes* sanguíneos: Morfológicamente muy semejante al anterior, sólo que se encuentran en el huésped mamífero donde transmiten la infección de una célula a otra o afectan al triatomino cuando estos ingieren la sangre de individuos o animales infectados (19).

#### **Mecanismos de patogenicidad.**

Quizás el problema más controvertido es la identificación de los mecanismos por los cuales se originan las lesiones que se presentan en los órganos durante la fase crónica, después de un período latente muy largo y cuando los parásitos son muy escasos. Los daños iniciales observados en la enfermedad aguda son directamente proporcionales a la destrucción de la célula huésped inducida por el protozoario. El edema intersticial podría reducir la capacidad de difusión del oxígeno, de tal manera que se crearían condiciones anóxicas que serían el origen de la muerte de las células vecinas. Sin embargo, estudios en ratones infectados han mostrado que la velocidad e intensidad del daño miocárdico es mayor que el que podría ser atribuido a este mecanismo. El daño a los tejidos parece estar relacionado con una infiltración crónica inflamatoria y como hay ausencia de parásitos se han propuesto los siguientes mecanismos para explicar el desarrollo de las lesiones de la fase crónica (25):

- a) La liberación de metabolitos por el parásito, que normalmente excretan o secretan al medio, los cuales podrían actuar como toxinas provocando daño neuronal que puede ser el causante de la cardiopatía y del daño en el tracto digestivo (25).
- b) Hipersensibilidad a productos del parásito, lo que desencadenaría un proceso inflamatorio con el daño subsecuente al tejido.
- c) Evolución de respuesta autoinmune como resultado de la interacción huésped-parásito. Este mecanismo ha sido apoyado con un gran número de hechos experimentales en los que se destaca la detección de anticuerpos específicos contra células neuronales y nervios periféricos en la mayoría de los pacientes chagásicos (25).

Los anticuerpos anticélulas neuronales podrían ser particularmente importantes para explicar la deservación que ocurre en ganglios del corazón y el sistema autónomo del tracto digestivo. Sin embargo la correlación entre esos anticuerpos contra tejidos del huésped y la morbilidad ha sido considerada como circunstancial y no existe una demostración definitiva para esta interrelación.

Cualquiera que sea el mecanismo patógeno, en todos los casos se producen cardiopatías agudas o crónicas que acortan la vida de los pacientes (5, 10).

### **Metabolismo de *T. cruzi*.**

#### **Transporte de carbohidratos, aminoácidos y proteínas.**

Al parecer *T. cruzi* no es capaz de sintetizar y almacenar polisacáridos, por lo que los carbohidratos deben ser continuamente incorporados para su utilización. Mientras esté presente la glucosa, los aminoácidos y las proteínas son comúnmente la reserva energética (12), los cuales son utilizados como fuente de energía sólo durante la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes (27).

Tanto los aminoácidos y la glucosa son transportados activamente por los epimastigotes, las proteínas son incorporadas por pinocitosis, la cual se lleva a nivel de la bolsa flagelar (14, 19).

El parásito es capaz de un rápido y completo rompimiento de aminoácidos como leucina y prolina para formar  $\text{CO}_2$ . La alta actividad de hidrolasas y proteasas se localiza en organelos del parásito que están involucrados en el rompimiento de compuestos almacenados.

*T. cruzi* tiene la capacidad de tomar y almacenar proteínas exógenas en organelos especiales llamados reservosomas, los cuales son movilizados bajo condiciones de estrés nutricional.

Los aminoácidos derivados del rompimiento de proteínas exógenas (previamente almacenados) actúan como carbono y fuente de energía bajo una gran variedad de circunstancias (33).

#### **Catabolismo de carbohidratos.**

Von Brand (35) fue el primero en establecer que los epimastigotes de *T. cruzi* son capaces de incorporar y consumir aminoácidos y carbohidratos, excretando al medio algunos catabolitos parcialmente reducidos de la glucosa, principalmente succinato y del metabolismo de aminoácidos al  $\text{NH}_3$ . Aunque se tienen controversias sobre cuales son los nutrientes más importantes para el parásito (31), se tienen aceptados los siguientes hechos:

1) Los epimastigotes son capaces de consumir los dos nutrientes, siendo la glucosa consumida primero, cuando ambos están presentes (15). Esto sucede a pesar de que el ambiente natural del epimastigote (intestino del insecto) es rico en aminoácidos y pobre en glucosa (25).

El crecimiento de epimastigotes en medios complejos, después de la degradación de carbohidratos es soportada por el catabolismo de aminoácidos indicado por la excreción de grandes cantidades de amonio al medio de crecimiento (33).

2) Las tres fases del parásito prefieren un tipo de nutriente sobre otros, de esta manera a) Amastigotes obtenidos en medios de cultivo, son exclusivamente glicolíticos, b) Epimastigotes utilizan glucosa en la fase logarítmica de crecimiento en medios de cultivo y los aminoácidos más activamente son consumidos en la fase estacionaria y c) Los Tripomastigotes metacíclicos son exclusivamente oxidativos, utilizan proteínas y aminoácidos en su metabolismo energético (32).

La glicólisis en *T. cruzi* presenta dos características diferentes a lo que sucede en el mamífero:

1) Las primeras seis de las enzimas glicolíticas (hexocinasa, fosfohexosa isomerasa, fosfofructocinasa, aldolasa, triosafosfato isomerasa y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) están localizadas en el glicosoma, vesícula de una sola membrana que va de 0.2-0.8  $\mu\text{m}$  de tamaño y en las preparaciones al microscopio electrónico su aspecto es globoso (25).

2) La hexocinasa y la fosfofructocinasa, enzimas claves en la regulación de la mayoría de los sistemas glicolíticos desde bacterias a mamíferos, en *T. cruzi* no son afectadas por los efectores más comunes (30). La única regulación importante encontrada es a nivel de la piruvato cinasa, la cual es fuertemente activada por muy bajas concentraciones de fructosa-1,6-difosfato la cual es capaz, aún en concentraciones micromolares, de contrarrestar el efecto inhibitorio de ATP y Pi (25).

Como resultado de la carencia de controles inhibitorios de la glicólisis, la operación de esta vía no es influida directa o indirectamente por el oxígeno, lo que resulta que el efecto Pasteur no se observe (16). El efecto Pasteur se observa en células que utilizan con mayor rapidez la glucosa en ausencia de oxígeno que en su presencia. Esta inhibición en el consumo de glucosa por el oxígeno hace que se produzca más energía en forma de ATP cuando la glucosa se oxida aeróbicamente a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  que cuando se convierte anaeróbicamente a lactato y  $\text{CO}_2$ .



Leyenda Figura 1. Metabolismo de *Trypanosoma cruzi*.

- 1 Hexocinasa
- 2 Fosfohexosa isomerasa
- 3 Fosfofructocinasa
- 4 Aldolasa
- 5 Triosafofato isomerasa
- 6 Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
- 7 Fosfogliceratocinasa
- 8 Fosfogliceratomutasa
- 9 Enolasa
- 10 Piruvato cinasa
- 11  $\alpha$ -hidroxiácido deshidrogenasa
- 12 Fosfoenolpiruvato carboxicinas
- 13 Enzima málica
- 14 Piruvato deshidrogenasa
- 15 Citrato-sintasa
- 16 Aconitasa
- 17 Isocitrato deshidrogenasa
- 18  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa
- 19 Succinato tiocinasa
- 20 Succinato deshidrogenasa
- 21 Fumarato reductasa
- 22 Fumarasa
- 23 Malato deshidrogenasa
- 24 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- 25 Acetil CoA hidrolasa
- 26 Alanina aminotransferasa
- 27 NAD-Glutamato deshidrogenasa

### **Productos finales del metabolismo de la glucosa.**

La glicólisis juega un papel muy importante en el aporte energético para el parásito, ya que a pesar de que se ha informado la presencia de todas las enzimas del ciclo de Krebs, éste ciclo sólo es utilizado parcialmente y además, en sentido inverso. La glucosa es catabolizada sólo parcialmente a  $\text{CO}_2$  aún bajo condiciones aeróbicas, con la producción principalmente de succinato, el cual es producido por la siguiente secuencia de reacciones. La fijación de  $\text{CO}_2$  por la fosfoenolpiruvato carboxilasa produce ácido oxalacético el cual es reducido a ácido málico, esto sucede dentro de los glicosomas. El malato sale al citosol y penetra a la mitocondria en donde es convertido a fumarato y finalmente succinato (25).

El succinato es el producto final principal del metabolismo energético en *T. cruzi* (21) seguido por la alanina, y el acetato, este último en poca cantidad, al igual que lactato, malato y piruvato (17) figura 1.

### **Sistema de reoxidación del NADH glicólico.**

Con el fin de permanecer funcional, todos los sistemas glicólicos deben contar con un eficiente sistema de reoxidación del NADH, generado en la reacción de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. *T. cruzi* tiene diferentes posibilidades para reoxidar al NADH, las cuales bajo condiciones aeróbicas todas son funcionales, estas son: a) cadena respiratoria, b) producción de succinato y probablemente de alanina y c) producción de lactato (17). La producción de lactato es a través de la actividad de deshidrogenasa láctica mediada por una enzima propia de *T. cruzi* denominada alfa-hidroxiácido deshidrogenasa (28).

### **Enzima PEPCK**

Una característica de la organización metabólica de *T. cruzi* es la presencia de un punto común (ranal) en el nivel de fosfoenolpiruvato (PEP) que es una enzima glicosomal llamada PEPCK.

Esta enzima es probablemente responsable del paso inicial de la vía que guía desde carbohidratos hasta succinato.

Está presente en todas las etapas del ciclo de vida del parásito y sus niveles celulares no son afectados por los niveles de glucosa en el medio.

Esta vía conduce irreversiblemente a Ciclo de Krebs a través de la piruvato cinasa y produce reversiblemente oxalacetato por la fijación de  $\text{CO}_2$  en PEP catalizada por PEPCK (33) figura 1.

## 2.2 Ciclo de vida de *T.cruzi*

*Trypanosoma cruzi* presenta un complejo ciclo de vida que involucra tanto a un mamífero como a un insecto transmisor (varias especies de triatomíneos). Bajo condiciones naturales, la infección de *T. cruzi* es iniciada por los tripomastigotes metacíclicos, que se encuentran en el tubo intestinal del triatomino. El insecto al alimentarse pica y succiona sangre del hombre o de otros mamíferos, cuando defeca origina heces u orina que contienen la fase infectante, tripomastigotes metacíclicos, los cuales penetran a través de mucosas, o bien por heridas o abrasiones en la piel (11). Especies de transmisores de mayor importancia epidemiológica defecan en lapsos más cortos, por lo que pueden originar la transmisión con mayor probabilidad (24).

El parásito sobrevive a la fagocitosis de los macrófagos ya que escapa de la vacuola fagocítica, antes de la fusión de los lisosomas (2), una vez en el citoplasma, se transforma en la fase intracelular, el amastigote, el cual inicia su reproducción, dividiéndose repetidamente por fisión binaria y destruyendo finalmente a la célula huésped, liberándose tripomastigotes, este ciclo reproductivo se repite varias veces y puede llevarse a cabo en cualquier tejido, ya que el tripomastigote puede entrar a células no fagocíticas, además se han encontrado sitios más frecuentemente afectados como son: miocardio, sistema nervioso central, sistema retículo endotelial y músculo liso del tracto intestinal, en estas localizaciones los amastigotes suelen agruparse formando "nidios" después de haber destruido varias células huésped (25).

Después de algún tiempo, los amastigotes se transforman dentro de los nidios en tripomastigotes sanguíneos, los cuales son liberados alrededor del tejido. Estas fases pueden invadir células en el área inmediata, o ser acarreados a otros tejidos por medio de la circulación sanguínea (3, 8).

Al estar circulando por la sangre, pueden ser ingeridos por el transmisor, al alimentarse y ya en su intestino se transforman en epimastigotes, estos se multiplican por fisión binaria transformándose después en tripomastigotes metacíclicos, completándose así el ciclo de vida. Otros artrópodos pueden mantener temporalmente la infección con *T. cruzi* y actúan como acarreadores del parásito por un corto tiempo (18) pero se considera sólo a los triatomíneos como el único grupo con importancia epidemiológica (13) figura 2.

## CELULA DEL MAMIFERO

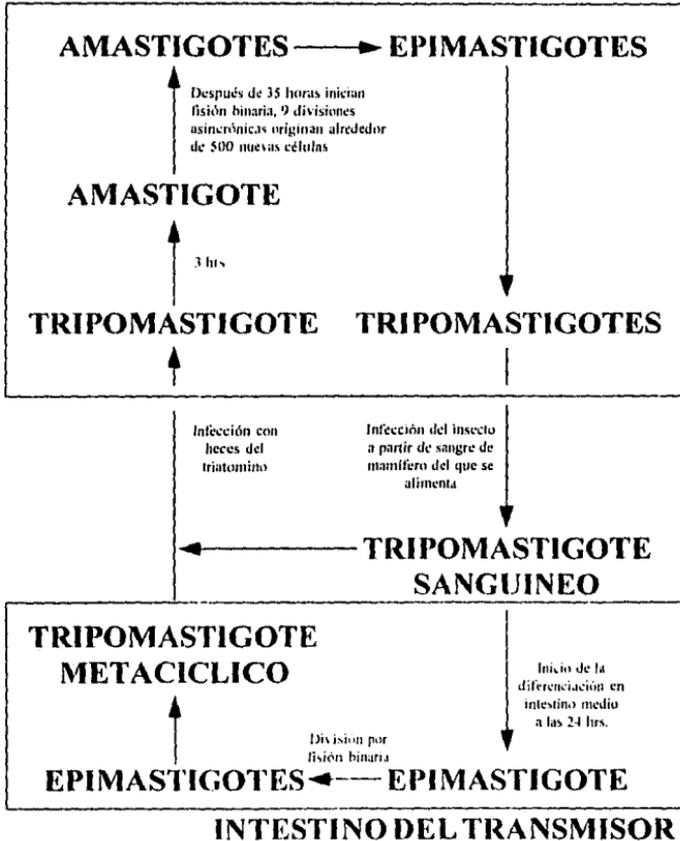


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

### 2.3 Modo de acción de los fármacos probados *in vivo*.

#### Nifurtimox

Nifurtimox (Bayer 2502, Lampit); los compuestos nitrofuránicos fueron ensayados desde 1952; dentro de estos nitrofuranos el Nifurtimox mostró ser el más indicado para el tratamiento de la infección chagásica (4).

Químicamente, Nifurtimox es un 4-([5-nitrofurilideno]-amino)-3-metiltiomorfolina-1,1-dióxido, sintetizado en 1962 en Alemania por Herlinger, Mayer y Petersen, para la casa Bayer. Su presentación es en forma de comprimidos conteniendo 120 mg de sustancia activa (4) figura 3.

#### Benznidazol

Benznidazol (Ro 7-1051, Rochagan, Radanil); esta sustancia fue sintetizada por el departamento de Pesquisas de los laboratorios Roche y los primeros resultados en terapéutica experimental fueron comunicados en 1973, en el XII Congreso Internacional de Terapéutica, en Ginebra (4).

Químicamente, el Benznidazol es N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida. Preparado y presentado en comprimidos conteniendo 100 mg de sustancia activa (4) figura 4.

Desde los estudios de Hoppe-Seyler en 1983 se sabe que en los organismos vivos las sustancias orgánicas nitradas son reducidas a su grupo nitro. Sus productos resultantes de esa reducción son fácilmente oxidados, con formación de radicales libres, algunos de ellos frecuentemente tóxicos. Los trabajos de Stoppani (29) con *T. cruzi*, demostraron que concentraciones farmacológicas de Nifurtimox son capaces de generar productos de reducción parcial del oxígeno, a saber, anión superóxido ( $O_2^-$ ) y agua oxigenada ( $H_2O_2$ ). El primer paso en esa serie de reacciones es la transferencia de un electrón del reductor NADPH al grupo nitro catalizada por una enzima nitroreductasa.

El segundo paso consiste en la transferencia del electrón libre al oxígeno, regenerando al nitrocompuesto y formando el anión superóxido; éste a su vez dismuta a peróxido de hidrógeno de manera espontánea o por la acción de la superóxido dismutasa. Por último en una reacción catalizada por hierro el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reacciona con el anión superóxido para dar origen al radical hidroxilo (20). Este radical ha sido postulado como uno de bajo peso molecular más dañino (20) figura 5.

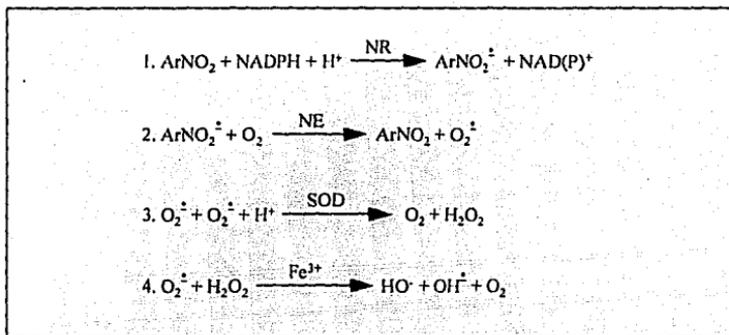


Figura 5. Mecanismo de generación de radicales libres por nitrocompuestos.

ArNO<sub>2</sub> = nitrocompuesto

NR = nitroreductasa

NE = reacción no enzimática

SOD = superóxido dismutasa

· = radical libre

En *T. cruzi* existen enzimas oxidativas que intervienen en la producción de peróxido de hidrógeno y del anión superóxido como la citocromo P-450 y la citocromo c reductasa. En mamíferos existen mecanismos que permiten eliminar la presencia de estos compuestos, pero en el parásito la eficiencia de eliminación de los peróxidos y superóxidos está disminuida por la ausencia de catalasa, α-tocoferol, ácido ascórbico y de glutatión peroxidasa. La actividad de superóxido dismutasa está presente en el parásito que además de lo anterior, lo hace susceptible a los radicales libres (25).

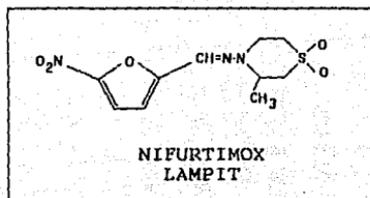


Figura 3. LAMPIT (Nifurtimox)

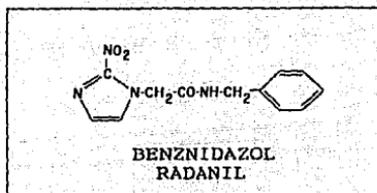


Figura 4. RADANIL (Benznidazol)

Los productos de la reducción parcial del oxígeno son tóxicos tanto para *T. cruzi* como para el huésped mamífero. El  $H_2O_2$  es capaz de actuar como oxidante y como reductor de hemoproteínas y de moléculas que contienen grupos tioles y el  $O_2^-$  es reductor

y oxidante, participando en reacciones que llevan a la peroxidación de lípidos. Por su parte el radical hidroxilo reacciona indiscriminadamente con cualquier tipo de moléculas, atacando grupos metilo, por ejemplo =C11- de los ácidos grasos insaturados y en esa forma inicia una cadena de reacciones de peroxidación que generan aldehídos de menor peso molecular, entre otros el dialdehído malónico (29).

#### 2.4 Trabajos previos sobre la susceptibilidad a fármacos

Brener (7) fue el primero en investigar la susceptibilidad de las formas circulantes de *T. cruzi* en la sangre a los compuestos activos. el autor se basó en el hecho de que las formas circulantes de *T. cruzi* inoculadas intravenosamente en los ratones persistieron por algunas horas en la corriente sanguínea sin penetrar en los tejidos del hospedero (6).

Los ratones experimentales fueron inoculados intravenosamente con la cepa y posteriormente tratados. Las drogas activas indujeron una rápida declinación en el número de parásitos sanguíneos demostrando la factibilidad de una prueba la cual puede detectar la actividad de la droga contra las formas circulantes en la sangre.

Brener (9) desarrolló un método que permite la evaluación *in vivo* y en corto tiempo la sensibilidad de cepas de *T. cruzi* a diferentes agentes quimioterapéuticos.

Inoculó ratones machos intraperitonealmente con tripomastigotes sanguíneos, y en el pico de la parasitemia se les administró una dosis de las drogas a prueba por vía oral.

El número de formas circulantes fue determinada antes y después de 2, 4, 6 y 8 horas de la administración de la droga. Algunos ratones igualmente inoculados se utilizaron como control. El porcentaje de reducción de la parasitemia se calculó comparando el número de parásitos obtenidos en cada período después de la administración de la droga con los encontrados antes del tratamiento.

Así también para una evaluación a largo plazo se emplearon ratones bajo las mismas condiciones que en la evaluación a corto plazo, sin embargo el tratamiento se llevó a cabo administrando 20 dosis consecutivas del fármaco por vía oral, comenzando 24 horas después de la inoculación.

También esta evaluación estuvo acompañada por controles.

Se realizaron revisiones de sangre fresca al menos 2 veces después del tratamiento (9).

Estas evaluaciones permiten determinar *in vivo* la susceptibilidad de cepas de *T. cruzi* a los medicamentos. Se observa una correlación entre los resultados obtenidos utilizando cepas sensibles y resistentes de *T. cruzi* con un método rápido y de los obtenidos en un período prolongado que incluye la administración de la droga por 20 días consecutivos (9).

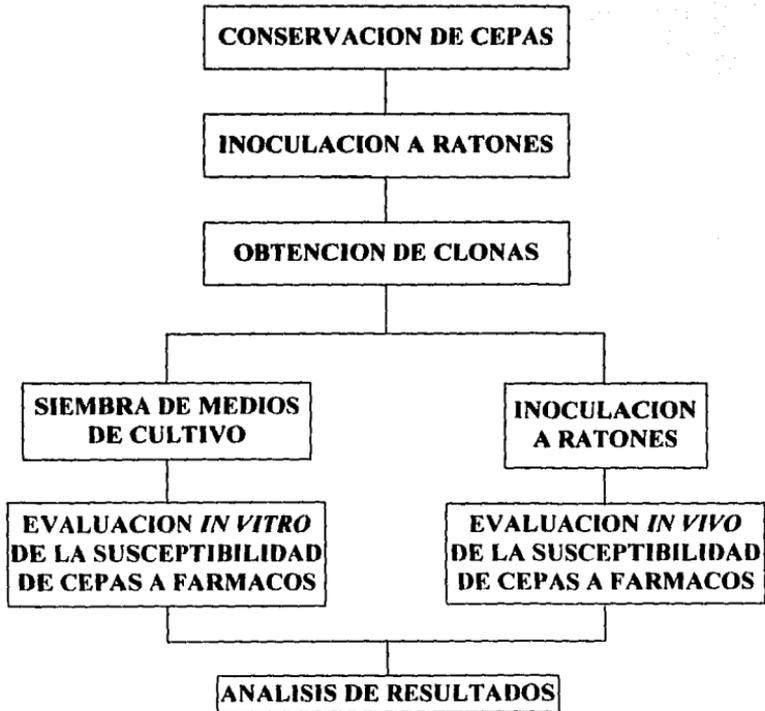
Los datos sugieren que el Benznidazol es más activo contra las formas sanguíneas que sobre formas intracelulares, un fenómeno que explica la persistencia de la infección después de un tratamiento prolongado.

El método de Blanco (1982) permite evaluar la actividad de fármacos *in vitro* a corto plazo. Consiste en colocar la fase líquida del medio de cultivo en el que ha crecido el parásito, en tubos eppendorf y añadir el fármaco en diferentes concentraciones. A continuación se realizará un conteo en Cámara de Neubauer de los parásitos sobrevivientes a diferentes períodos.

### CAPITULO III

## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Diagrama de flujo general



### **3.2 Material, reactivos y equipo**

#### **3.2.1 Material biológico**

##### **-Clonas CID-1 y MIGUZ-1:**

Las clonas de las cepas CID y MIGUZ aisladas por xenodiagnóstico de casos humanos en el Estado de Oaxaca, fueron donadas por el Laboratorio de Protozoología del Departamento de Parasitología, ENCB.

El xenodiagnóstico consiste en poner a afimentar insectos transmisores (triatominos) de la enfermedad sobre un paciente sospechoso de estar infectado con *T. cruzi*. Después de un período de incubación se revisan al microscopio las deyecciones de los insectos en búsqueda del parásito. Esta técnica es empleada para aislar cepas de *T. cruzi* a partir de casos humanos o reservorios así como para ayudar a realizar el seguimiento de la parasitemia durante el tratamiento (1).

##### **-Sangre desfibrinada de conejo**

##### **-Sangre desfibrinada de carnero (vial)**

##### **-Animales de experimentación :**

Ratones (*Mus musculus*)

Cepa NIH

Hembras de 20 g de peso

#### **3.2.2 Material de laboratorio**

-Matraces Erlenmeyer con tapón de rosca Pyrex (de 50,100,250 y 500 ml)

-Vasos de precipitado Pyrex (de 50,100,250 y 500 ml)

-Tubos de ensayo Pyrex de 13x100

-Probetas Pyrex (de 50,100 y 500 ml)

-Pipetas graduadas Pyrex (de 1.2,5 y 10 ml)

-Pipetas automáticas Wheaton (de 200-1000  $\mu$ l y de 50-200  $\mu$ l)

-Pipetas automáticas Gilson (de 20 y 200  $\mu$ l)

-Pipeta de Thoma para la cuenta de glóbulos blancos

-Cámara de Neubauer

-Tubería de hule con boquilla

-Pipetas Pasteur

-Bulbos de hule

- Tubos eppendorf (de 1 ml)
- Agitador de vidrio
- Mortero y pistilo de porcelana
- Mechero de Bunsen
- Asa bacteriológica
- Sonda plástica
- Cinta testigo
- Espátulas de acero inoxidable
- Tijeras
- Algodón
- Guantes de látex
- Cubreboea
- Cinta testigo

### **3.2.3 Reactivos**

- Base de agar sangre (BIOXON)
- Infusión de cerebro y corazón (BIOXON)
- Cloruro de sodio (PRODUCTOS QUIMICOS MONTERREY, S.A.)
- Penicilina G Procaína Cristalina
- Sulfato de estreptomina
- Fenol (JT BAKER S.A. DE C.V.)
- Etanol absoluto (MERCK)
- Benzimidazol: Ro 7-1051: Radamil
- Nifurtimox: Bayer 2502: Lampit
- Agua destilada

### **3.2.4 Equipo**

- Autoclave Industrias Steele Presto Modelo 21L
- Balanza granataria OHAUS
- Balanza analítica Sartorius
- Microscopio binocular Carl Zeiss. West Germany
- Incubadora Precisión Gravity Convention Incubator G.C.A. Corporation
- Refrigerador Cabhers

### **3.3 Metodología**

#### **3.3.1 Métodos**

##### **Método de Brener (1984).**

##### **Prueba *in vivo*:**

Las cepas CID y MIGUZ se conservan en el Laboratorio de Entomología en triatomíneos alimentados con sangre de ratón o de conejo.

Las cepas se mantienen en ratones por pases repetidos de sangre de ratón a ratón.

Las clonas de las cepas se obtuvieron por medio de siembra de diluciones seriadas en medios sólidos.

A partir de las clonas obtenidas, se inoculó con 10,000 tripomastigotes sanguíneos a cuatro lotes de ratones vía intraperitoneal ( 2 lotes por clona) para lograr una máxima parasitemia.

Cada lote estuvo formado por 12 ratones. En cada lote cinco ratones se utilizaron para la prueba con la dosis de 500 mg/kg de Radanil, cinco para la prueba con la dosis de 500 mg/kg de Lampit y dos fueron utilizados como testigos.

Se realizó una suspensión de cada fármaco, según se explica adelante en cálculo de las dosis administradas.

El día de máxima parasitemia o 20avo. día (establecido en el Laboratorio de Entomología), se administraron los fármacos por vía oral utilizando una sonda plástica y a los ratones testigo (igualmente inoculados) se les administró agua por la misma vía como placebo.

Antes de la administración del fármaco, se contó el número de parásitos con la Cámara de Neubauer. Así prosiguió el conteo a las 2,4,6 y 8 horas posteriores a la administración de cada fármaco.

Al término de el experimento se sacrificaron los ratones.

##### **Cálculo de las dosis administradas:**

##### **Radanil:**

Comprimidos de 260 mg al 38.46% de pureza se maceraron en mortero para facilitar su suspensión en agua y además para pesar la cantidad necesaria en cada dosis.

Se contó con ratones de 20 g (aproximadamente). Para administrarles una dosis de 500 mg/kg de peso, se pesaron 520 mg del comprimido y se suspendió en 20 ml de agua destilada administrándole 1 ml a cada ratón.

Lampit:

Comprimidos de 400 mg al 30% de pureza se maceraron en mortero para facilitar su suspensión en agua y además para pesar la cantidad necesaria en cada dosis.

Se contó con ratones de 20 g (aproximadamente). Para administrarles una dosis de 500 mg/kg de peso, se pesaron 800 mg del comprimido y se suspendió en 20 ml de agua destilada administrándole 1 ml a cada ratón.

**Conteo con la Cámara de Neubauer:**

- 1) Practicar un pequeño corte en la vena caudal del ratón.
- 2) Tomar sangre directamente con la pipeta de Thoma para la cuenta de glóbulos blancos hasta la marca de 0.2.
- 3) Aforar con cloruro de sodio al 0.85% hasta la marca de 1.0.
- 4) Depositar la muestra homogeneizada en la Cámara de Neubauer.
- 5) Con el objeto de determinar la cantidad de tripomastigotes sanguíneos por milímetro cúbico contar cuatro cuadros grandes de la cámara y multiplicar el número de parásitos contados por 20 (factor de dilución)

**Preparación de cloruro de sodio al 0.85%:**

Pesar en la balanza analítica 0.85 g de cloruro de sodio y disolverlo en 100 ml de agua destilada.

**Preparación de medios de cultivo**

El medio de cultivo consta de dos fases: sólida y líquida.

**Preparación de la fase sólida:**

Esta fase se prepara con el medio de cultivo deshidratado Base de agar sangre suspendiendo 3 g en cada 100 ml de agua destilada.

Se deja reposar durante 5 minutos.

Se hierve y esteriliza 1 minuto a 121°C durante 15 minutos.

Después de esterilizar, se añade 6.5% de sangre estéril defibrinada de conejo o de camero (vial).

Se vacía en los matracos con tapón de rosca, colocándose en posición inclinada para que así solidifiquen.

**Preparación de la fase líquida:**

Esta fase se prepara con solución salina al 0.85% añadiéndose Infusión de cerebro y corazón al 0.1%.

Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

A continuación en la fase líquida se añade Penicilina G Procaína Cristalina y Sulfato de estreptomicina.

El último paso es la incorporación de la fase líquida en los matraces que ya poseen la fase sólida.

**Preparación de fármacos:**

El Radanil y Lampit se preparan de acuerdo a las diluciones mostradas en las tablas 1 y 2. Las diluciones son realizadas en etanol absoluto para ambos fármacos, el cual también funciona como testigo.

Se parte de soluciones 1M, que se preparan disolviendo:

676 mg de Radanil (pureza 38.46 %) en 1 ml de etanol

957 mg de Lampit (pureza 30%) en 1 ml de etanol

**Método de Blanco (1982).****Prueba *in vitro*:**

Se prepararon medios de cultivo difásicos y se inoculó una serie de cinco con la clona CID-1 y otra serie con la clona MIGUZ-1.

Estos medios se mantuvieron en la incubadora a 28°C para lograr un óptimo crecimiento.

A los 12 días, se revisó el crecimiento de la población de las clonas en sus respectivos medios de cultivo.

Al existir abundantes parásitos y no haber contaminación por hongos o bacterias, se tomaron muestras de 500 µl en tubos eppendorf.

A continuación se prepararon las diluciones de cada fármaco, según se explica adelante en la preparación de fármacos y en las tablas 1 y 2.

Se añadieron 3 µl de cada dilución del fármaco en cada tubo eppendorf que ya contenía el medio de cultivo.

Así también en otro tubo eppendorf con medio de cultivo, se añadieron 3 µl de etanol absoluto (disolvente de los fármacos) como testigo.

Se tomó una muestra con el asa bacteriológica, colocándola en un portaobjetos y encima un cubreobjetos.

Se revisó al microscopio (40X) a los 0, 30, 60, 90 Y 120 minutos después de haber añadido el fármaco.

Al final se desecharon los porta y cubreobjetos en fenol al 5%.

Se reportaron los porcentajes de reducción de la población de cada clona (parásitos no sobrevivientes), después de haber revisado 10 parásitos en cada uno de 10 campos.

**Preparación de fenol al 5%:**

El fenol se prepara pesando en la balanza granataria el 5% de fenol de un volumen determinado de agua destilada en el cual se disuelve

Tabla 1. Preparación del fármaco Radanil a diferentes diluciones

Se parte de soluciones 1 M, que se preparan disolviendo: 676 mg de Radanil (pureza 38,46%) en 1 ml de etanol.

RADANIL Peso molecular = 260 g/mol	a 1 M	b 0.1 M	c 0.01 M	d 0.001 M 1 mM	e 0.0001 M 0.1 mM 100 µM	f 0.00005 M 0.05 mM 50 µM	g 0.00001 M 0.01 mM 10 µM	h 0.000005 M 0.005 mM 5 µM	i 0.000001 M 0.001 mM 1 µM
DILUCION	→	→	→	→	→	→	→	→	
mg/ml	260	26	2.6	0.26 $2.6 \times 10^{-1}$	0.026 $2.6 \times 10^{-2}$	0.013 $1.3 \times 10^{-2}$	0.0026 $2.6 \times 10^{-3}$	0.0013 $1.3 \times 10^{-3}$	0.00026 $2.6 \times 10^{-4}$
g/ml	0.26	0.026	0.0026	0.00026 $2.6 \times 10^{-4}$	0.000026 $2.6 \times 10^{-5}$	0.000013 $1.3 \times 10^{-5}$	0.0000026 $2.6 \times 10^{-6}$	0.0000013 $1.3 \times 10^{-6}$	0.00000026 $2.6 \times 10^{-7}$

Disolvente: Etanol Absoluto

Tabla 2. Preparación del fármaco Lampit a diferentes diluciones

Se parte de soluciones 1 M, que se preparan disolviendo: 957 mg de Lampit (pureza 30%) en 1 ml de etanol.

LAMPIT Peso molecular = 287 g/mol	a 1 M	b 0.1 M	c 0.01 M	d 0.001 M 1 mM	e 0.0001 M 0.1 mM 100 µM	f 0.00005 M 0.05 mM 50 µM	g 0.00001 M 0.01 mM 10 µM	h 0.000005 M 0.005 mM 5 µM	i 0.000001 M 0.001 mM 1 µM
DILUCION	1:10 →	1:10 →	1:10 →	1:10 →	0.5:1 →	0.2:1 →	0.5:1 →	0.2:1 →	
mg/ml	287	28.7	2.87	0.287 $2.87 \times 10^{-1}$	0.0287 $2.87 \times 10^{-2}$	0.0143 $1.43 \times 10^{-2}$	0.00287 $2.87 \times 10^{-3}$	0.00143 $1.43 \times 10^{-3}$	0.000287 $2.87 \times 10^{-4}$
g/ml	0.287	0.0287	0.00287	0.000287 $2.87 \times 10^{-4}$	0.0000287 $2.87 \times 10^{-5}$	0.0000143 $1.43 \times 10^{-5}$	0.00000287 $2.87 \times 10^{-6}$	0.00000143 $1.43 \times 10^{-6}$	0.000000287 $2.87 \times 10^{-7}$

Disolvente: Etanol Absoluto

## CAPITULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Resultados

Las tablas I y II muestran los porcentajes de sobrevivencia de la población de la clona CID-1 cuando se probó *in vitro* la actividad tripanomicida de el Radanil y Lampit respectivamente.

En la tabla V, para una mejor apreciación de los resultados, se presentan los porcentajes de reducción (parásitos no sobrevivientes) de la población de la clona CID-1 debido a la actividad de el Radanil y Lampit al termino de la prueba (120 minutos) lo cual está representado en la gráfica I.

Las tablas III y IV muestran los porcentajes de sobrevivencia de la población de la clona MIGUZ-1 cuando se probó *in vitro* la actividad tripanomicida de el Radanil y Lampit respectivamente.

En la tabla VI, para una mejor apreciación de los resultados, se presentan los porcentajes de reducción (parásitos no sobrevivientes) de la población de la clona MIGUZ-1 debido a la actividad de el Radanil y Lampit al termino de la prueba (120 minutos) lo cual está representado en la gráfica II.

Los resultados que se presentan en la tabla VII corresponden a los porcentajes de sobrevivencia de la clona CID-1 en las pruebas *in vivo* frente a el Radanil y Lampit. estos resultados corresponden a la gráfica III.

Los resultados que se presentan en la tabla VIII corresponden a los porcentajes de sobrevivencia de la clona MIGUZ-1 en las pruebas *in vivo* frente a el Radanil y Lampit, estos resultados corresponden a la gráfica IV.

Para apreciar mejor el comportamiento de los fármacos, en la gráfica V se muestra la actividad *in vivo* del Radanil sobre las clonas CID-1 y MIGUZ-1 y en la gráfica VI se muestra la actividad *in vivo* del Lampit sobre las mismas clonas.

Tabla I Porcentajes de sobrevivencia de la clona CID-1 en la evaluación *in vitro* de la actividad del Redemil a diferentes concentraciones.

TIEMPO (min)	0.1 M	0.01 M	0.001 M	100 $\mu$ M	50 $\mu$ M	10 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	TESTIGO
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
30	75	80	80	85	85	85	90	95	100
60	75	75	85	85	85	85	85	90	100
90	85	75	80	80	80	85	85	85	100
120	60	60	70	80	80	80	85	85	100

Tabla II Porcentajes de sobrevivencia de la clona CID-1 en la evaluación *in vitro* de la actividad del Lempit a diferentes concentraciones.

TIEMPO (min)	0.1 M	0.01 M	0.001 M	100 $\mu$ M	50 $\mu$ M	10 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	TESTIGO
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
30	90	90	95	95	95	95	100	100	100
60	85	90	90	90	90	95	95	100	100
90	75	80	80	90	90	90	95	95	100
120	85	75	80	80	80	90	90	85	100

Tabla III Porcentajes de sobrevivencia de la clona MIQUZ-1 en la evaluación *in vitro* de la actividad del Radenol a diferentes concentraciones.

TIEMPO (min)	0.1 M	0.01 M	0.001 M	100 $\mu$ M	50 $\mu$ M	10 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	TESTIGO
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
30	85	85	85	95	100	100	100	100	100
60	80	80	85	90	95	95	100	100	100
90	75	80	80	85	90	80	80	90	100
120	55	65	75	80	85	90	90	90	100

Tabla IV Porcentajes de sobrevivencia de la clona MIQUZ-1 en la evaluación *in vitro* de la actividad del Lampi a diferentes concentraciones.

TIEMPO (min)	0.1 M	0.01 M	0.001 M	100 $\mu$ M	50 $\mu$ M	10 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	TESTIGO
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
30	90	90	100	100	100	100	100	100	100
60	80	85	90	90	90	90	90	100	100
90	75	75	85	85	85	90	80	95	100
120	60	65	75	75	75	80	80	90	100

**Tabla V** Evaluación *in vitro* de la actividad del Radanil a diferentes concentraciones sobre las clones CID-1 y MIGUZ-1 de *T. cruzi*.

Porcentajes de reducción de la población a los 120 minutos de prueba.

Concentración (Ml)	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00005	0.000001	0.000005	0.0000001	Testigo
Clona CID-1	40	40	30	20	20	20	15	15	0
Clona MIGUZ-1	45	35	25	20	15	10	10	10	0

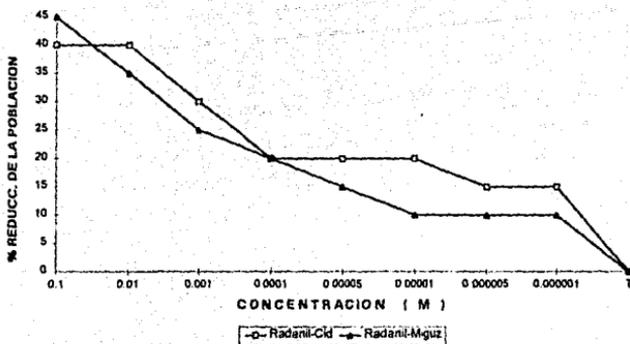
**Tabla VI** Evaluación *in vitro* de la actividad del Lampit a diferentes concentraciones sobre las clones CID-1 y MIGUZ-1 de *T. cruzi*.

Porcentajes de reducción de la población a los 120 minutos de prueba.

Concentración (Ml)	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00005	0.000001	0.000005	0.0000001	Testigo
Clona CID-1	35	25	20	20	20	10	10	5	0
Clona MIGUZ-1	40	35	25	25	25	20	20	15	0

**Gráfica I**

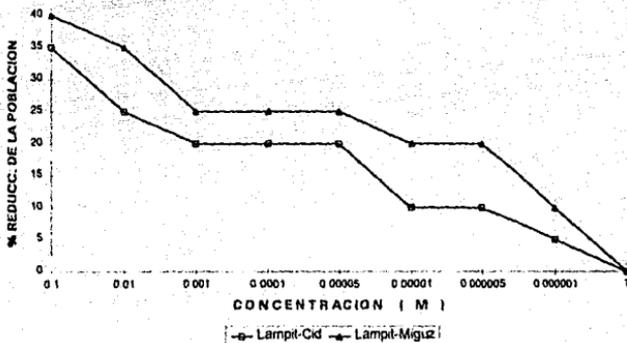
Evaluación *in vitro* de la actividad del Radanil sobre las poblaciones de las clonas CID-1 y MIGUZ-1 de *T. cruzi*.



Realizada siguiendo la metodología establecida por Blanco (1982).

**Gráfica II**

Evaluación *in vitro* de la actividad del Lampit sobre las poblaciones de las clonas CID-1 y MIGUZ-1 de *T. cruzi*.



Realizada siguiendo la metodología establecida por Blanco (1982).

Tabla VII Evaluación *in vivo* de la actividad del Radanil y Lampit a una dosis de 500 mg/Kg sobre la parasitemia originada por la clona CID-1.

Tiempo (Hrs)	0	2	4	6	8
Radanil	100	65	45	40	38
Testigo	100	100	100	100	100
Lampit	100	75	50	45	48
Testigo	100	100	100	100	100

Se empleó agua destilada en los lotes de ratones testigo.  
Porcentaje de sobrevivencia de los parásitos.

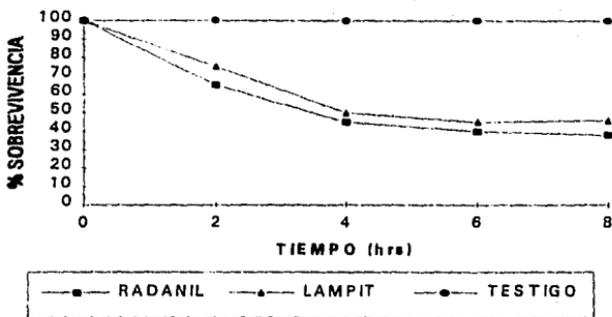
Tabla VIII Evaluación *in vivo* de la actividad del Radanil y Lampit a una dosis de 500 mg/Kg sobre la parasitemia originada por la clona MIGUZ-1.

Tiempo (Hrs)	0	2	4	6	8
Radanil	100	80	75	70	70
Testigo	100	100	100	100	100
Lampit	100	98	95	94	95
Testigo	100	100	100	100	100

Se empleó agua destilada en los lotes de ratones testigo.  
Porcentaje de sobrevivencia de los parásitos.

### Gráfica III

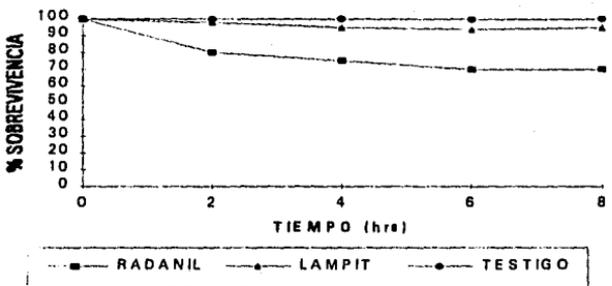
Evaluación *in vivo* de la actividad del Radanil y Lampit sobre la parasitemia originada por la clona CID-1 de *T. cruzi*.



La administración de los fármacos fue por vía oral a una dosis de 500 mg/Kg siguiendo la metodología propuesta por Brener (1984).

### Gráfica IV

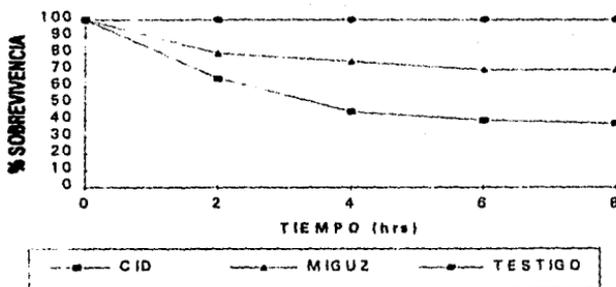
Evaluación *in vivo* de la actividad del Radanil y Lampit sobre la parasitemia originada por la clona MIGUZ-1 de *T. cruzi*.



La administración de los fármacos fue por vía oral a una dosis de 500 mg/Kg siguiendo la metodología propuesta por Brener (1984).

### Gráfica V

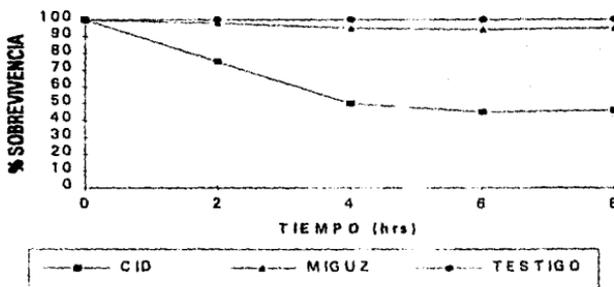
Evaluación *in vivo* de la actividad del Radanil sobre la parasitemia originada por las clonas CID-1 y MIGUZ-1 de *T. cruzi*.



La administración de los fármacos fue por vía oral a una dosis de 500 mg/Kg siguiendo la metodología propuesta por Brener (1984).

### Gráfica VI

Evaluación *in vivo* de la actividad del Lampit sobre la parasitemia originada por las clonas CID-1 y MIGUZ-1 de *T. cruzi*.



La administración de los fármacos fue por vía oral a una dosis de 500 mg/Kg siguiendo la metodología propuesta por Brener (1984).

## 4.2 Discusión

Se emplearon clones de las cepas CID y MIGUJ aisladas en Oaxaca, México para conocer la actividad de los fármacos de elección sobre estas poblaciones de *T. cruzi* en las pruebas *in vitro* mediante el método de Blanco y en las pruebas *in vivo* mediante el método de Brener.

El empleo de clones de *T. cruzi* es necesario, ya que es posible que los aislados (cepas) están constituidos por una heterogeneidad de poblaciones del parásito, lo cual originaría constantes cambios en los resultados obtenidos al emplearlos, aunque se pierde lo representativo de lo que ocurre en la naturaleza.

El método de Brener permite determinar *in vivo* y en corto tiempo (8 horas) la sensibilidad y/o resistencia de las formas sanguíneas de cepas (y de sus respectivas clones) de *T. cruzi* a los fármacos.

Brener inicialmente basó su método en el hecho de que las formas sanguíneas inoculadas intravenosamente persistían por algunas horas en el torrente sanguíneo sin penetrar a los tejidos del huésped. Posteriormente modificó el método empleando la vía intraperitoneal tal como se empleó en el presente trabajo, para evitar o disminuir el riesgo de que rápidamente el parásito invadiera los tejidos del huésped después de la inoculación.

Lo anterior se planteó por el hecho de que existe heterogeneidad en las cepas de *T. cruzi* lo que implica que tengan diferentes características y siendo así algunas cepas pudieran tener mayor velocidad de invasión a las células de órganos.

En base a el análisis de las gráficas obtenidas del comportamiento de las clones ensayadas (en el Laboratorio de Entomología), se eligió el día 20 avo. como el de máxima parasitemia para realizar la prueba *in vivo*.

Se utilizó el método de conteo con la Cámara de Neubauer ya que es confiable.

La administración del fármaco por vía oral en las pruebas *in vivo* ofrece ventajas importantes sobre las pruebas *in vitro*, como son:

- a) Da una idea más real acerca de la eficiencia de los fármacos contra el parásito
- b) Las condiciones del tratamiento son semejantes en el hombre

La aplicación de los fármacos es una etapa delicada en el experimento. Se debe evitar en lo posible el estrés de los animales por exceso de manipulación y el daño mecánico por introducción de la aguja, ya que los ratones en los que no se tienen estas precauciones presentan una conducta diferente de la normal como es poca actividad y mala alimentación.

El Radanil y el Lampit son compuestos con baja solubilidad en agua, por lo tanto las pruebas *in vivo* se llevan a cabo con una suspensión de anibos fármacos y las pruebas *in vitro* se dificultan debido a la necesidad de utilizar compuestos que faciliten su solubilidad además de emplearse bajas concentraciones.

La parasitemia originada por CID-1 disminuyó un 62% al término de 8 horas de evaluar la actividad tripanocida *in vivo* de el Radanil y un 54% al evaluar la actividad de el Lampit.

La clona MIGUZ-1 presentó una reducción del 30% de su población frente al Radanil y un 5% debido a el Lampit bajo las mismas condiciones.

En las pruebas *in vitro*, la clona CID-1 fue sensible al Radanil y parcialmente sensible al Lampit mientras que la clona MIGUZ-1 fue sensible al Lampit y parcialmente sensible a el Radanil.

Al cabo de los 120 minutos de probar el Radanil *in vitro* con las clonas CID-1 y MIGUZ-1, los porcentajes de reducción de la población de la clona CID-1 debido a el fármaco fueron desde el 40% con la concentración mayor (0.1 M) hasta 15% con la menor concentración (0.000001 M) y los porcentajes de reducción de la población de la clona MIGUZ-1 frente a el mismo fármaco variaron desde el 45% con la mayor concentración hasta el 10% con la menor concentración.

Con respecto a los porcentajes de reducción de la población de las clonas debido a el Lampit en el término de las pruebas *in vitro* (120 min.), los porcentajes de la clona CID-1 variaron desde 35% con la mayor concentración del fármaco hasta el 5% empleando la menor concentración del mismo y los porcentajes de la clona MIGUZ-1 registrados por la actividad del fármaco varían desde el 40% para la mayor concentración y 10% empleando la menor concentración.

Como fue incrementándose la concentración de los fármacos, aumentó el porcentaje de reducción de la población de ambas clonas durante los 120 minutos de prueba.

## CAPITULO V

## CONCLUSION

1. En las pruebas *in vivo*, la clona CID-1 fue sensible al Radanil y Lampit siendo MIGUZ-1 resistente a los mismos.
2. En las pruebas *in vitro*, las clonas no presentaron diferencias en cuanto a la sensibilidad y/o resistencia frente a ambos fármacos.
3. El Radanil fue más activo sobre la clona CID-1 *in vivo*, en las pruebas *in vitro* también fue sensible CID-1 y MIGUZ-1 parcialmente sensible.
4. El Lampit mostró mayor actividad sobre CID-1 *in vivo*, en las pruebas *in vitro* MIGUZ-1 fue sensible y CID-1 parcialmente sensible.
5. En las pruebas *in vivo* si hay diferencias entre la actividad de cada fármaco sobre ambas clonas.
6. En las pruebas *in vitro* no existieron diferencias entre los porcentajes de reducción de la población de la clona CID-1 y los porcentajes de la clona MIGUIZ-1 frente a ambos fármacos.
7. Las diferencias en el comportamiento frente a los fármacos empleados es una prueba de la heterogeneidad de las poblaciones de *T. cruzi* que se encuentran en la naturaleza.
8. Las pruebas para determinar la resistencia y/o susceptibilidad de las diferentes cepas de *T. cruzi* ( y de sus respectivas clonas ) a diferentes fármacos son importantes para la caracterización de las mismas.
9. Los resultados mostraron la importancia de aislar el parásito de los pacientes con el fin de evaluar los fármacos que se le pretende administrar.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Alejandro, A. R., B. Noguera T. y M. Cortés-Jiménez. Susceptibilidad de cinco especies de Triatomíneos a la infección con *Trypanosoma cruzi*. Revista Latinoamericana de Microbiología 35(4). 1993
- 2) Avila, J.L. Chagas' disease. Sixth programme report. TDR/PR-6/UNADP/WORLD BANK/WHO, 1983.
- 3) Avila, J.L. Intracellular Digestion of Endocytosed Proteins as a Source of Amino Acids for Protein Synthesis in *Trypanosoma cruzi*. Avila and Harris, Subcellular Biochemistry: Intracellular Parasites, Plenum Press, Vol. 18, pgs. 189-234, New York, USA, 1992.
- 4) Boainain, E. Tratamiento Etiológico de Doença de Chagas na fase crônica. Rev. Goia Med. 25:1-60. 1979.
- 5) Braun, M. Respuesta inmune al *Trypanosoma cruzi*. Un enfoque de patogenia en la enfermedad de Chagas. Acta Physio Pharmacol. Latinoam. 35: 1-47. 1985
- 6) Brener, Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood stream of normal and immune mice. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 63(2). 1969
- 7) Brener, Z. Study of the action of some active drugs against *Trypanosoma cruzi* blood forms Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 13: 302-306. 1971.
- 8) Brener, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Rev. Microbiol. 27: 347-382. 1973
- 9) Brener, Z., and Filardi. A rapid method for testing *in vivo* the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79(2): 221-225. 1984.

- 10) Brener, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. In meeting on immunopathology and pathogenesis of Chagas disease, leishmaniasis and leprosy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 82: 205-213. 1987.
- 11) Calvo, M.M.L., B. Noguera T., y R. Alejandro A. La vía oral: una puerta de acceso para *T. cruzi*. Rev. Lat. Microbiol. 34(1): 39-41. 1992
- 12) Cannata, J.J.B., and Cazzulo, J.J. The aerobic fermentation of glucose by *T. cruzi* Comp. Biochem. Physiol. 79B: 297-308. 1984.
- 13) Carcavallo, R. CHAGAS DISEASE' VECTORS, CRC Press, Vol. III, pg. 1-20, USA, 1985.
- 14) Cazzulo, J. J. Protein and amino acid metabolism in *T. cruzi* Comp. Biochem. Physiol. 79B: 309-320. 1984.
- 15) Cazzulo, J.J. et al. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in Trypanosomatids. Mol Biochem. Parasitol. 16: 329-343. 1985.
- 16) Cazzulo, J.J., Arauzo, S., Franke de Cazzulo, B.M., and Cannata, J.J.B. On the production of glicerol and L-alanine during the aerobic fermentation of glucose by Trypanosomatids FEMS Microbiol. Lett. 51: 187-192. 1988.
- 17) Cazzulo, J.J. Energy Metabolism in *Trypanosoma cruzi* Avila and Harris, Sub cellular Biochemistry: Intracellular Parasites, Plenum Press, Vol. 18, pgs. 235-252, New York. USA, 1992.
- 18) Cortés-Jiménez, M., B. Noguera T., y R. Alejandro A. Transmisión experimental de *Trypanosoma cruzi* por *Ornithonyssus bacoti*. Veterinaria de México. 25(1): 39-41. 1994.
- 19) De Souza, W. Cell biology of *T. cruzi*. Int. Rev. Cytol. 86: 197-283. 1984.
- 20) Docampo, R., and Moreno, S. N. J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi* Rev. Infect. Dis. 6: 223-238. 1984.

- 21) Gutteridge, W. E. *Trypanosoma cruzi*: recent biochemical advances Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 75(4): 1981.
- 22) Hoare, C.A., and Wallace, F.G.. Developmental stages of Trypanosomatid flagellates and new terminology. Nature 212: 1385-1386. 1986.
- 23) Montamat, E.E., C. Burgos, N.M. Gerez de Burgos, L. E. Rovai, A. Blanco, and E.L. Segura. Inhibitory Action of Gossypol on Enzymes and Growth of *Trypanosoma cruzi*. Science, 218: 288-289. 1982.
- 24) Noguera T.B., Alejandro A. R. y Cortés-Jimenez, M. Evaluación de la capacidad de transmisión de *T. cruzi* de cinco especies de triatomíneos. I. Patrones de defecación. Zoología Informa. 1993.
- 25) Noguera T.B., I. Baeza R. y C. Wong. Orientación actual de la Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. Acta Médica, 27(105-106): 37-56. 1991
- 26) Repetto, Y. Letellier, M. E., Aldunate, J., and Morello, A. The  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase of *Trypanosoma cruzi* Comp. Biochem Physiol. 87B: 73-78. 1987.
- 27) Rodríguez, F., Ramírez, J. L., and Rangel-Aldao, R. Gene expression of tubulin during the differentiation of *T. cruzi* Abstracts, VI PAABS Congress, Sao Paulo, Brazil p. 70. 1990.
- 28) Rovai, L. E., A. Aoki, N. M. Gerez de Burgos, and A. Blanco. Effect of Gossypol on Trypomastigotes and Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* J. Protozoology 37(4): 280-286. 1990.
- 29) Stoppani, A. Bioquímica de *Trypanosoma cruzi* Interciencia 8(6): 1983.
- 30) Taylor, M. B., and Gutteridge, W. E. The regulation of phosphofruktinase in epimastigote *T. cruzi* FEBS Lett, 201: 262-266. 1986.

- 31) Urbina, J. A., and Azavache, V. Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes II NAD<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase Mol. Biochem. Parasitol. 11: 241-253. 1984.
- 32) Urbina, J. A., Osorno, C. E., and Rojas, A. The central role of phosphoenol pyruvate carboxikinase in the energy metabolism of *T. cruzi* Studies using 3-mercaptopicolinic acid. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 84: Suppl II: sg. 1989.
- 33) Urbina, J. A. Intermediary Metabolism of *Trypanosoma cruzi* Parasitology Today. 10(3): 107-110. 1994.
- 34) Velasco, O. Importancia de la enfermedad de Chagas en México. Rev. Lat-amer. Microbiol. 28: 275-283. 1986.
- 35) Von Brand, Th. Biochemistry and Physiology of Endoparasites Elsevier/North Holland, Amsterdam. Holland. 1979.
- 36) W.H.O. World Health Organization UNDP/ WORLD BANK/ WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease: Actividades de pesquisa do Scientific Working Group (SWG) on Chagas disease 1982/1985 - Relatório dos "Screening Committee" (SC) ao "Scientific and Technical Review Committee" (STRC). Compilado por Moncayo, A. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 81(8): 179-183. 1986.
- 37) W.H.O. World Health Organization Division of Control of Tropical Disease (CTD) UNDP/ WORLD BANK/ WHO. Special programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR). American Tripanosomiasis CTD-TDR/HH90. 1: 12-13. 1990.