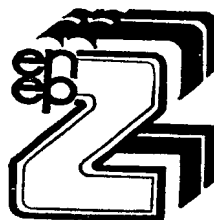


24/4



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"**



**EFEECTO TERAPEUTICO DEL RADANIL (Ro 7-1051)
SOBRE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EXPERI-
MENTAL EN RATONES BLANCOS PRODUCIDA POR
DOS CEPAS MEXICANAS DE Trypanosoma cruzi.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO.

P r e s e n t a :

Carmen Edith Baños Gómez



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.

CONTENIDO

	Págs.
1.- INTRODUCCION - - - - -	1 - 9
2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA - - - - -	10-12
3.- OBJETIVOS - - - - -	13
4.- HIPOTESIS - - - - -	14
5.- MATERIAL - - - - -	15
6.- METODOS - - - - -	16-22
7.- RESULTADOS - - - - -	23-38
8.- DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS - - - - -	39-45
9.- CONCLUSIONES - - - - -	46-47
10.- BIBLIOGRAFIA - - - - -	48-51

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas es causada por Trypanosoma cruzi, protozoario flagelado del orden de los Cinetoplástidos. Es transmitido por insectos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, géneros Triatoma, Pastróngylus y Rhodnius, siendo los del género Triatoma los principales transmisores en México (28).

La mayor parte de las infecciones humanas resultan del depósito de los excrementos semilíquidos de los triatomas infectados en las mucosas expuestas, particularmente en el ángulo parpebral externo, alrededor de las ventanas nasales y de los labios. Las heces de los transmisores infectados contienen tripanosomas metacíclicos; el depósito se produce casi siempre mientras los insectos se alimentan de la sangre (11).

En el ciclo biológico de Trypanosoma cruzi se presentan cuatro estadios evolutivos relacionados con los medios diferentes en el que habita el parásito (fig.1) los estadios son:

1) Amastigote: Con cuerpo ovoide de 2µm. de diámetro, núcleo central. Es una forma de multiplicación -- por fisión binaria que se encuentra intracelularmente en los reservorios y en el hombre.

2) Promastigote: De cuerpo fusiforme largo y delgado, núcleo central, cinetoplasto pequeño distal anterior y un flagelo anterior. Se encuentra en el tubo di

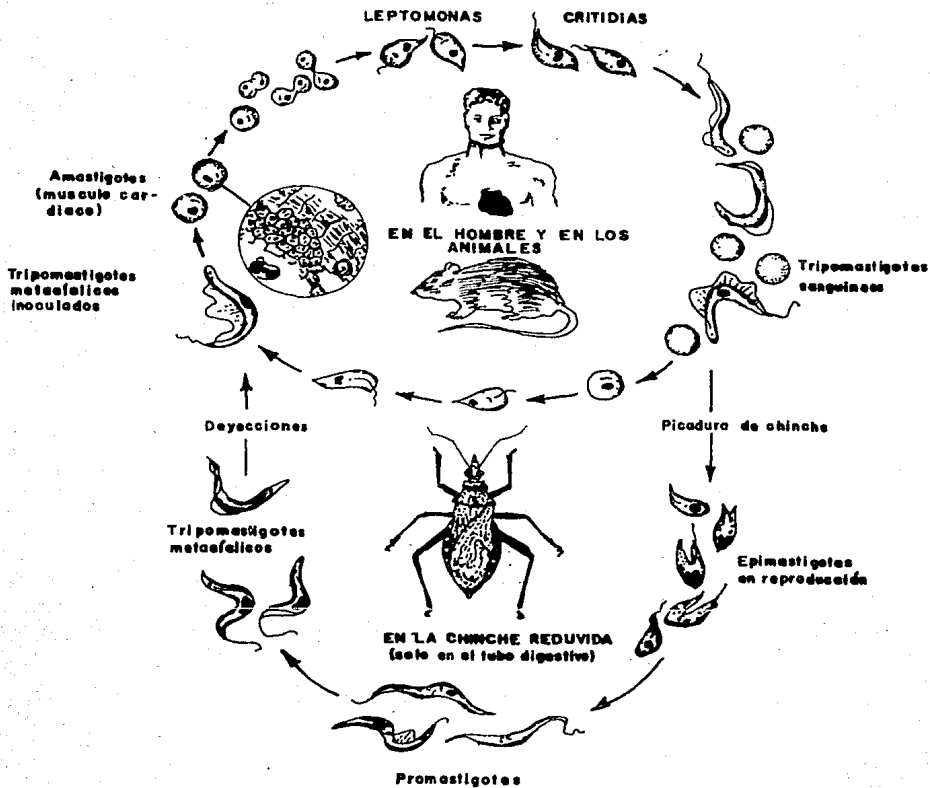


FIG. 1 Ciclo vital de *Trypanosoma cruzi*

gestivo del vector.

3) Epimastigote: Con un cuerpo fusiforme de 20 μ m. -- de longitud, nucleo central, cinetoplasto anterior muy cercano al nucleo y un flagelo que al principio contournea una membrana ondulante desde su salida hasta la -- porción terminal del cuerpo. Es otra forma de multipli- cación que se desarrolla en el tubo digestivo del vec- tor y en cultivos.

4) Tripomastigote: De cuerpo fusiforme con 20 μ m. -- de longitud, nucleo central, cinetoplasto posterior de donde sale el flagelo que contournea una membrana ondu- lante a lo largo de casi todo el cuerpo del parásito. Los tripomastigotes se encuentran tanto en el vector - como en el huesped donde reciben diferentes nombres; - en las heces del vector se les llaman "metacíclicos" y son la fase infectiva para el hombre, en la sangre del huesped están los "sanguíneos" que son la fase infectí- va para el vector (10).

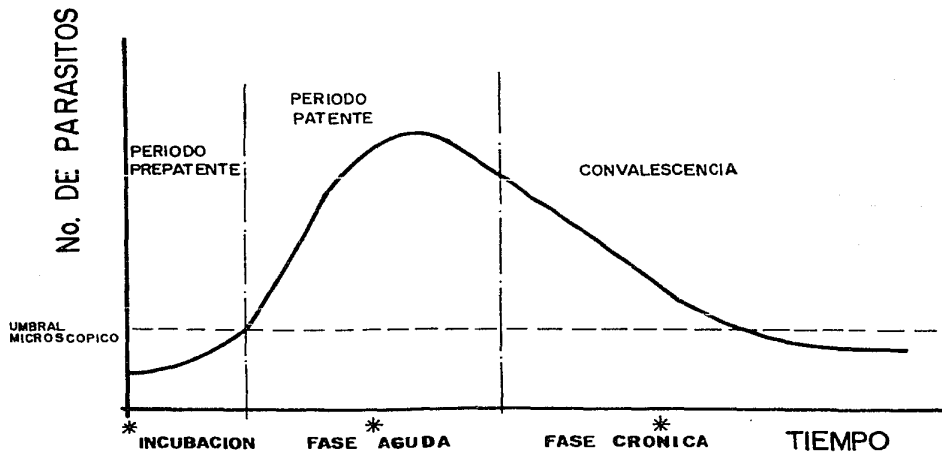
La patología general de la infección por Trypanoso- ma cruzi en el hombre y en los animales de experimenta- ción presenta cuatro fases distintas (fig. 2):

I.- Período de incubación: Existe proliferación de amastigotes dentro de las células, transferencia de -- una célula a otra en forma de tripomastigote. Con una duración aproximada de tres semanas.

II.- Fase Aguda: Se caracteriza por un "chagoma", - fiebre y hepatoesplenomegalia. El "chagoma" es una le-

FIG. 2

CURSO DE LA ENFERMEDAD



si3n cut3nea nodular en el sitio de entrada, cuando -- 3ste es la conjuntiva puede producirse una lesi3n edematosa en el p3rpado (signo de Romania). La duraci3n de 3sta fase es de dos a tres semanas, acompaada de fiebre y parasitemia con la invasi3n de varios 3rganos -- siendo los m3s comunes el coraz3n, es3fago y c3lon.

III.- Fase Indeterminada 3 Latente: No se observa -- una enfermedad cl3nica, contin3a una parasitemia baja debido a la constante multiplicaci3n intracelular. Pue de durar indefinidamente 3 convertirse en cr3nica.

IV.- Enfermedad Cr3nica: Aparece despu3s de diez -- a3os de iniciada la infecci3n, caracterizada por dis-- funci3n de los 3rganos afectados; en el coraz3n se observa miocarditis progresiva, fibrosis y destrucci3n -- del tejido conductor; en el aparato digestivo se produce disperistalsis, megaes3fago y megac3lon (19).

El diagn3stico se confirma por la reacci3n de Gue-- rreiro-Machado 3 la demostraci3n del par3sito en un -- frotis 3 gota gruesa de sangre, inoculaci3n a cuyo 3 -- rat3n, cultivo y xenodiagn3stico que consiste en que -- el paciente sea picado por triatomas limpios en cuyas deyecci3nes se observa el par3sito despu3s de 7 d3as.

La enfermedad de Chagas descubierta en 1909 por Car los Chagas conocida tambien como tripanomiasis americana es uno de los principales problemas de salud p3blica en paises sudamericanos como Brasil, Argentina, Chile y Venezuela (9,11).

En los países de América del Sur, principalmente en Brasil se vienen realizando observaciones sistemáticas sobre el tratamiento de la enfermedad de Chagas, desde 1912; de los intentos más sobresalientes de tratamiento se encuentran los siguientes:

a) Uso de medicamentos curativos de leishmaniasis, como los antimoniales, por su semejanza morfológica -- con los amastigotes.

b) Se han usado medicamentos efectivos contra la enfermedad del sueño como la Suramina y las diamidinas, pero son ineficaces para destruir las formas intracelulares del Trypanosoma cruzi.

c) Sustancias que mostraban regresión de la fiebre y disminución de la parasitemia en la fase aguda, así se probaron diferentes agentes terapéuticos como la -- Primaquina, Pentaquina, Isopentaquina, Spirotripan y -- otros que por su toxicidad no se podían utilizar por -- periodos prolongados y no conducían a curas definitivas (5,8).

A partir de 1960 se empezaron a buscar medicamentos que se pudieran administrar de manera prolongada con -- el intento de eliminar el parásito de la sangre y de -- los tejidos, así se probaron sustancias de diferentes grupos químicos como arsenobencenos, 8-aminoquinolinas, 5-nitrofuranos, 5-nitrotiazoles, 5-nitroimidazoles, 2-nitroimidazoles (9,14,15).

En más de 70 años solamente 14 estructuras químicas básicas se han reportado con actividad contra Trypano-

soma cruzi en animales de laboratorio, de las cuales solamente 8 tienen suficiente actividad que justifique su uso en la clínica y de éstos solamente 3 se encuentran bajo intensas pruebas que aseguren su uso; éstas son: 8-aminoquinolínas, 5-nitrofuranos y 2-nitroimidazoles. Recientemente las 8-aminoquinolínas se están abandonando por su toxicidad y teratogenicidad (21).

Actualmente el 5-nitrofurano Lampit (Nifurtimox ó Bayer 2502) y el 2-nitroimidazol Radanil (Benznidazol ó Roche 7-1051) se están utilizando para el tratamiento en sudamérica (9).

El Radanil, químicamente es el N-bencil-2-nitro-1-imidazolacetamida (fig. 3), es producido por "Laboratorios Roche" en la presentación de comprimidos de 100mg. Los estudios farmacocinéticos reportan que en el hombre la absorción es rápida y después de 3 a 4 horas se alcanzan niveles de 2.3 a 2.8 μ g/ml en plasma, sigue la cinética de un modelo monocompartmental y la vida media de eliminación es de 12 horas con una disponibilidad de 91.7 % (23).

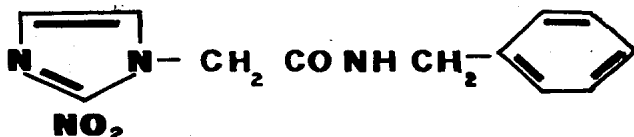
Reportes sobre tratamientos de larga duración mencionan que si se sigue un tratamiento por cuatro semanas con Radanil se mantiene una concentración en equilibrio constante, por lo que se le considera como un fármaco adecuado para repetir un cuadro de dosis como se requiere en la enfermedad de Chagas (24).

En 1974 se presentaron los primeros resultados del tratamiento con Radanil en pacientes con enfermedad de

FIG. 3

RADANIL

N - benzil - 2 - nitro - 1 imidazol -
acetamida.



ROCHE 7-1051

BENZNIDAZOL

CINETICA DE UN COMPARTIMENTO

$t_{1/2}$ eliminacion: 12 hrs.

DISPONIBILIDAD: **91.7%**

ABSORCION: **3-4 hrs** 2.3-2.8 $\mu\text{g/ml}$

Chagas aguda y crónica, en donde se reporta que los -- pacientes con enfermedad aguda mejoraron notablemente el cuadro clínico y los enfermos crónicos se mantuvieron con xenodiagnósticos negativos hasta por un año -- después del tratamiento con 5 mg./Kg./día (2 tomas) -- por 60 días (12, 20).

Otros trabajos reportan que con el uso del Radanil en ratones infectados experimentalmente se observa clara regresión de las lesiones tisulares producidas por Trypanosoma cruzi en la fase crónica, (3).

En la administración prolongada del Radanil se han observado diferentes efectos colaterales que van desde cefalea, insomnio, intolerancia digestiva y fiebre hasta erupción cutánea, pigmentación palmar y plantar seguida de descamación, dermatitis aguda y alteraciones psíquicas que han sido reversibles al suspender el tratamiento (2, 12, 20).

Se tienen reportes de 1980 que el Nifurtimox y el -- Radanil son compuestos tóxicos a células de mamíferos "in vitro" (1).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Por primera vez se encontró Trypanosoma cruzi en México en 1939. Desde entonces hasta 1961 solamente se habían informado de 6 casos humanos comprobados parasitológicamente. De 1960 a 1980 se reportaron 142 casos humanos, la mayoría de ellos ocurrieron en regiones que se encuentran en la vertiente del Océano Pacífico desde Zacatecas hasta el sur del país; siendo Chiapas, Jalisco y Oaxaca los estados de mayor prevalencia (28, 13).

Se han encontrado triatomíinos infectados con Trypanosoma cruzi en por lo menos una localidad de todos -- los estados de la República Mexicana, la mayor parte -- de éstas se encuentran en altitudes de 0 a 1800 metros sobre el nivel del mar, lo que hace suponer que la zona endémica de la enfermedad de Chagas es muy amplia (25, 28).

Además del mecanismo de transmisión de Trypanosoma cruzi es posible la transmisión por coito, con la secreción láctea, por vía placentaria, por la ingestión accidental de artrópodos parasitados y transfusiones sanguíneas (11, 16), ésta última es quizá la fuente de infección más importante de la enfermedad en zonas donde las infecciones humanas naturales no son comunes -- (15, 16).

Las condiciones sociales tienen mucha importancia --

en la enfermedad de Chagas, la cual afecta principalmente a las clases más pobres. Las habitaciones humanas de construcción precaria junto con la ignorancia de la población son los factores más importantes en el desarrollo de los vectores y su adaptación al domicilio humano, los insectos transmisores viven en las grietas, orificios y techos. La infección la adquieren más frecuentemente los niños cuando duermen, pues de ellos se alimentan los triatomas infectados que al terminar de hacerlo defecan depositando los tripanosomas metacíclicos cerca de la picadura, los cuales penetran por la misma picadura ó por la acción mecánica del rascado (10, 18, 19).

Los diferentes mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas plantean la posibilidad de encontrar individuos infectados con Trypanosoma cruzi que no presentan sintomatología sino que actúan como portadores aumentando la propagación, lo que nos lleva a pensar que ésta enfermedad es un problema potencial de salud pública al que no se le ha brindado la atención que merece, como lo demuestra el hecho de que en nuestra república no tengamos a disponibilidad los exámenes de laboratorio para diagnosticar la enfermedad así como una quimioterapia para tratar a los pacientes que la presentan.

El Nifurtimox y el Radanil son medicamentos usados en sudamérica para el tratamiento de la enfermedad de

Chagás en donde muchos millones de personas presentan ésta enfermedad y alrededor del 10 % mueren generalmente después de un curso crónico y frecuentemente asintomático (19, 22).

Las cepas de Trypanosoma cruzi modifican su virulencia en diferentes especies, disminuyéndola por pases sucesivos en vertebrados y recuperándose al pasarlas al transmisor invertebrado (29). Se han encontrado diferencias de susceptibilidad entre cepas de Trypanosoma cruzi a un mismo medicamento, éstas diferencias de comportamiento también se han observado entre cepas aisladas en una misma región geográfica (3, 4, 7, 8).

Se tienen reportes sobre la destrucción de formas amastigotes además de las tripomastigotes así como regresión de lesiones tisulares en animales tratados con Radanil (Ro 7-1051) en relación a los no tratados con éste medicamento (4).

Motivados por éstos reportes, así como la diferencia de susceptibilidad de cepas de Trypanosoma cruzi, nos planteamos el problema de determinar si dos cepas aisladas de dos personas provenientes de Putla, estado de Oaxaca, atendidas en agosto de 1982 en el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales son susceptibles a la acción terapéutica del Radanil (Ro 7-1051).

OBJETIVOS

- a) Determinar las curvas de parasitemia de dos cepas de Trypanosoma cruzi aisladas de dos casos humanos del estado de Oaxaca, "CID" y "MIGUZ".
- b) Determinar experimentalmente la susceptibilidad de las cepas anteriores al Radanil (Ro 7-1051) a la dosis de 5 mg/Kg/día (2 tomas orales) durante 15 días en ratones blancos cepa CD1.
- c) Determinar si el Radanil (Ro 7-1051) a la dosis empleada actúa efectivamente contra las dos fases de la infección producida por las cepas -- "CID" y "MIGUZ" de Trypanosoma cruzi.

HIPOTESIS

El Radanil (Ro 7-1051) a la dosis de 5 mg/Kg/día (2 tomas orales) durante 15 días es un medicamento efectivo contra las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas producida por las cepas "CID" y "MIGUZ" de Trypanosoma cruzi, en ratones blancos - cepa CD1 y es tolerable al huesped experimental.

MATERIAL

Triatomas infectados con la cepa "CID" de T. cruzi

Triatomas infectados con la cepa "MIGUZ" de T. cruzi

Ratones machos de 20-30 g. de peso, cepa CDL

Conejo

Radanil (Ro 7-1051), comprimidos de 100 mg.

Ninfas de IV estadio de Triatoma pallidipennis.

MÉTODOS

La descripción de los métodos sigue el orden del diagrama de flujo marcado en la fig. 4.

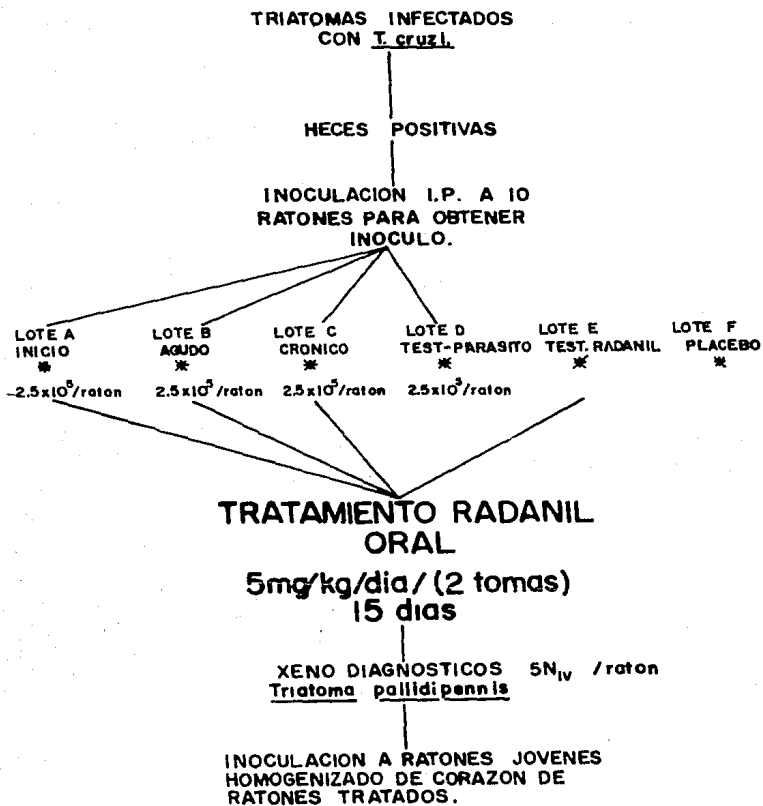
- Obtención del inóculo.

Las cepas "CID" y "MIGUZ" fueron aisladas de casos humanos por medio de xenodiagnóstico. Los triatomas infectados se alimentaron con sangre de conejo directamente del animal con tiempos variables; en cuanto se les observó el abdomen extendido fueron retirados y suspendidos en pequeños tubos de vidrio para coleccionar la heces semilíquidas con los tripanosomas metacíclicos. El manejo de éste material patógeno fué de acuerdo a la "Guía de sugerencias para el trabajo con Trypanosoma cruzi vivo" (17).

El material fecal se diluyó con solución salina estéril, para evitar la desecación y facilitar su manejo. - Se inocularon intraperitonealmente 5 ratones jóvenes de la cepa CD1. Después de 15 días se observaron abundantes tripanosomas en sangre. Los animales se sacrificaron obteniéndose la mayor cantidad de sangre con la que se hizo una suspensión con solución salina estéril, evitando la coagulación con heparina.

Se utilizó la técnica de conteo de glóbulos blancos en cámara de Neubauer para determinar la concentración de tripanosomas contenidos en la suspensión. A partir de ésta se inocularon los ratones de los lotes de trabajo.

EFFECTO TERAPEUTICO DEL RADANIL Ro7-1051 SOBRE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN RA- TONES BLANCOS.



* 5 RATONES

FIG. 4

- Formación de lotes.

El grupo de 60 ratones se distribuyó en 6 lotes de 5 ratones cada uno, para cada cepa de Trypanosoma cruzi "CID" y "MIGUZ" respectivamente. Cada lote representa una diferente fase de la enfermedad de Chagas, como se observa en la siguiente tabla:

LOTE	FLAGELADOS	INICIO DEL TRATAMIENTO	FASE DE LA INFECCION
A	2.5×10^5	Inmediato	Inicial
B	2.5×10^5	15 días	Aguda
C	2.5×10^5	30 días	Crónica
D	2.5×10^5	-----	Test-Parásito
E	-----	15 días	Test-Radanil
F	-----	-----	Placebo

El placebo utilizado fué agua destilada estéril, -- pues fué el líquido de dilución del Radanil, con la -- misma técnica de administración.

En todos los lotes se siguió el esquema posológico -- de 5 mg/Kg/día (2 tomas orales) durante 15 días de admi -- nistración del Radanil (Ro 7-1051).

- Recuento de tripanosomas.

La técnica de recuento de glóbulos blancos en cámara de Neubauer descrita por Davidsohn en (10), se utilizó de la siguiente forma:

Se aspiró cuidadosamente la sangre de la cola del ratón con la pipeta de Thoma para glóbulos blancos, hasta la marca 0.5 limpiando el exceso de sangre. Con solución de cloruro de amonio 0.85 % se llenó hasta la marca 11, quedando una dilución 1:20. Se agitó vigorosamente la pipeta por 3 minutos, las tres primeras gotas se desecharon y con la siguiente gota se llenó la cámara de Neubauer por capilaridad.

En el microscopio, con el objetivo 10x se contaron los tripanosomas que se encontraban dentro de los 4 cuadros destinados habitualmente para la cuenta de glóbulos blancos.

De ésta forma la concentración de tripanosomas se obtuvo mediante la siguiente relación:

$$\text{Tripanosomas} = \frac{N \times 20}{(0.1 \text{ mm}) (1 \text{ mm})^2 4}; \text{ donde}$$

N = Número de tripanosomas contados

20 = Dilución de la sangre

0.1 = Altura de la cámara

1 mm² = Area de un cuadro

4 = Número de cuadros contados. Finalmente:

$$\text{Tripanosomas/ mm}^3 = N \times 50.$$

- Administración oral del Radanil (Ro 7-1051).

El Radanil (Ro 7-1051) se encuentra disponible en comprimidos de 100 mg. Se han probado diversos esquemas posológicos encontrándose que el de 5 mg/Kg/día - (2 tomas) presenta menos reacciones secundarias (12, 20), por lo que se eligió éste esquema. Para administrarlo se pulverizaron los comprimidos y se suspendieron en agua destilada estéril. Para asegurar dosis -- completas y evitar pérdidas por regurgitación se empleó una sonda oral.

- Xenodiagnóstico.

Como uno de los criterios de cura se utilizó el xenodiagnóstico seriado (6,26), efectuándose cada 15 -- días sobre los ratones tratados.

Cinco ninfas limpias del IV estadio de Triatoma pallidipennis se dejaron libres para que se alimentaran del ratón atrapado en una trampa dentro de un cristallizador. En cuanto los triatomas se encontraban bien alimentados se retiraban colocándolos en frascos separados etiquetados de acuerdo al xenodiagnóstico correspondiente. Pasados 15 días se alimentaron sobre conejo colectando las heces y examinándolas al microscopio en busca de tripanosomas.

- Homogenizado de corazón.

Otra prueba de cura que se utilizó fué la inoculación de homogenizado de tejido a ratones jóvenes (6) de la misma cepa; específicamente de corazón.

Se sacrificaron los animales sobrevivientes al tratamiento después de tres xenodiagnósticos seriados extirpándoseles el corazón y lavándolo repetidas veces para eliminar las formas sanguíneas del tripanosoma.

En un mortero de porcelana estéril se fragmentó el tejido completamente, formando una suspensión con a--gua destilada estéril. Esta suspensión se inoculó intraperitonealmente a tres nuevos ratones jóvenes de - la cepa CD1 por cada ratón sobreviviente.

- Analisis de gota de sangre en fresco.

Con ésta técnica se busca la presencia ó ausencia de tripanosomas en la sangre periférica del ratón, al rededor de los 15 días posteriores a la inoculación - con homogenizado de corazón.

Se desinfecta la cola del ratón con alcohol al 70%, con una tijera de disección se corta la punta de la - cola, de la cual se extrae una gota de sangre que se coloca sobre un portaobjetos al que previamente se le ha colocado una gota de cloruro de amonio al 85 %. Con

la ayuda de un cubreobjetos se homogeniza la sangre y se cubre con el mismo. En el microscopio, con el objetivo de 10 x se buscan los tripanosomas móviles. Su presencia se considera como "positiva" y su ausencia como "negativa".

RESULTADOS.

Los resultados para cada lote se encuentran en las tablas y gráficas de la No. 1 a la No. 5.

En cada una de las tablas se muestran los resultados para las dos cepas de trabajo; en la parte superior la cepa "MIGUZ" y en la inferior la cepa "CID" de Trypanosoma cruzi. Para cada cepa la tabla se divide en dos; la primera parte muestra los resultados obtenidos por conteo en cámara de Neubauer de la concentración de tripanosomas/mm³, conforme transcurrió el tiempo en días, para cada ratón del lote; la segunda parte muestra los resultados de los xenodiagnósticos seriados realizados sobre los ratones sobrevivientes, después del tratamiento. Los xenodiagnósticos seriados se reportan en forma de fracción, donde el denominador de ésta indica el número de ninfas de IV estadio de Triatoma pallidipennis limpias empleadas por ratón y el numerador indica cuantas de éstas cinco ninfas se hallaron positivas al tripanosoma.

En las tablas se indica la dosis empleada para cada lote, que en todos fué la misma, es decir, 5mg/Kg/día - en dos tomas orales, ó sea, cada 12 horas se administró la mitad de la dosis.

A cada una de las tablas se les graficó la concentración de tripanosomas promedio de cada lote con respecto al tiempo en días, indicándo en que días se rea

lizaron los xenodiagnósticos, también se señalan las muertes ocurridas durante el estudio (26, 27, 30).

A cada uno de los lotes de trabajo le corresponde una tabla y una gráfica; es decir, al lote A le corresponde la tabla 1 y la gráfica 1 y así sucesivamente -- hasta el lote F.

De los resultados obtenidos se desprende lo siguiente:

En el lote A ó fase de "iniciación de la infección" para la cepa "MIGUZ" existe asociación entre el tiempo en que se realizó el xenodiagnóstico y la presencia -- del tripanosoma, conforme pasa el tiempo los parásitos en el triatoma se hacen más evidentes. Para la cepa -- "CID" todos los xenodiagnósticos seriados resultaron -- positivos.

Para el lote B ó fase "aguda" en la cepa "MIGUZ" -- hay una tendencia a encontrar xenodiagnósticos negativos, mientras que en la cepa "CID" se siguen observando xenodiagnósticos positivos independientemente del -- tiempo.

En las dos cepas, el lote C ó fase "crónica" hay -- tendencia a presentar xenodiagnósticos positivos independientemente del tratamiento.

Con el lote D ó "test-parásito" se construyeron las curvas de parasitemia. A éste lote no se le administró el medicamento. En las curvas de parasitemia se observa claramente la diferencia que existe entre las dos cepas de Trypanosoma cruzi estudiadas. La cepa "MIGUZ" presen

TABLA I

LOTE A FASE DE INICIACION DE LA INFECCION

CEPA MIGUZ DE Trypanosoma cruzi
 tripanosomas / mm³

TRATADOS CON RADANIL ORAL 5mg/Kg/día(2 tomas)/5 días

DIAS	ratón 1	ratón 2	ratón 3	ratón 4	ratón 5	\bar{x}	s	e.s	$\bar{x}+e.s$	$\bar{x}-e.s$
3	MUERTO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6		MUERTO	0	MUERTO	0	0	0	0	0	0
9			0		0	0	0	0	0	0
12			0		0	0	0	0	0	0
15			0		0	0	0	0	0	0
XENOD ₁₅			0 / 5		0 / 5					
XENOD ₃₀			2 / 5		3 / 5					
XENOD ₄₅			0 / 5		0 / 5					

CEPA CID DE Trypanosoma cruzi
 tripanosomas / mm³

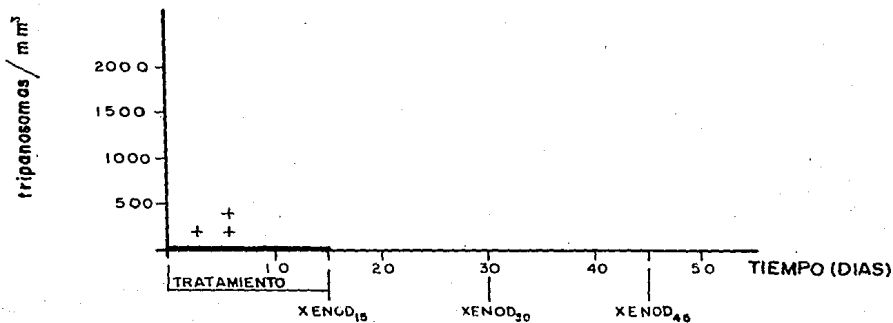
TRATADOS CON RADANIL ORAL 5mg/Kg/día(2 tomas)/5 días

DIAS	ratón 1	ratón 2	ratón 3	ratón 4	ratón 5	\bar{x}	s	e.s	$\bar{x}+e.s$	$\bar{x}-e.s$
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	MUERTO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9		0	0	MUERTO	0	0	0	0	0	0
12		0	0		0	0	0	0	0	0
15		MUERTO	0		0	0	0	0	0	0
XENOD ₁₅			4 / 5		4 / 5					
XENOD ₃₀			1 / 5		3 / 5					
XENOD ₄₅			3 / 5		3 / 5					

LOTE A FASE INICIACION

CEPA "MIGUZ" de Trypanosoma cruzi

TRATAMIENTO: RADANIL ORAL
5mg/Kg/día / 15 días
+ RATON MUERTO



CEPA "CID" de Trypanosoma cruzi

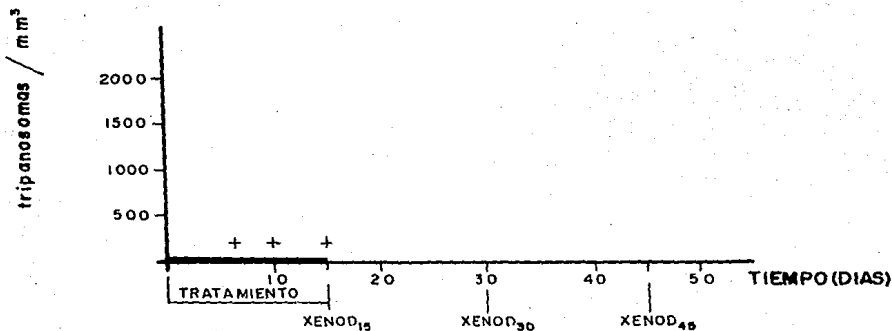


TABLA 2

LOTE B FASE AGUDA DE LA INFECCION

CEPA MIGUZ DE Trypanosoma cruzi

tripanosomas mm^3

TRATADOS CON RADANIL ORAL 5mg/Kg/dia(2 tomas)/15 dias

DIAS	ratón 1	ratón 2	ratón 3	ratón 4	ratón 5	\bar{x}	s	e. s	$\bar{x} + e. s$	$\bar{x} - e. s$
25	1300	1100	1050	1350	1250	1210	115.75	51.77	1261.77	1158.25
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	MUERTO	MUERTO								
XENOD ₄₀			0/5	0/5	0/5					
XENOD ₅₅			0/5	0/4	0/5					
XENOD ₇₀			0/5	MUERTO	0/5					

CEPA CID DE Trypanosoma cruzi

tripanosomas / mm^3

TRATADOS CON RADANIL ORAL 5mg/Kg/dia(2 tomas)/15 dias

DIAS	ratón 1	ratón 2	ratón 3	ratón 4	ratón 5	\bar{x}	s	e. s	$\bar{x} + e. s$	$\bar{x} - e. s$
15	2 600	3 700	3 300	2 800	3 000	3 080	366.78	178.97	3252.97	2907
20	350	2 350	300	450	1500	990	810.80	362.60	1352.60	627.40
25	250	MUERTO	200	0	0	112.5	115.88	49.78	159.80	40.24
30	MUERTO		0	0	0	0	0	0	0	0
XENOD ₃₀			3/5	0/5	2/5					
XENOD ₄₅			2/5	2/5	4/5					
XENOD ₆₀			MUERTO	0/5	0/5					

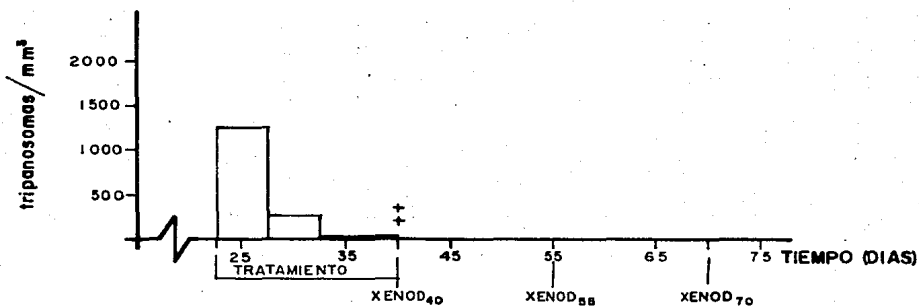
LOTE B FASE AGUDA

TRATAMIENTO: RADANIL ORAL

5mg/Kg/día / 15 días

+ RATON MUERTO

CEPA "MGUZ" de Trypanosoma cruzi



CEPA "CID" de Trypanosoma cruzi

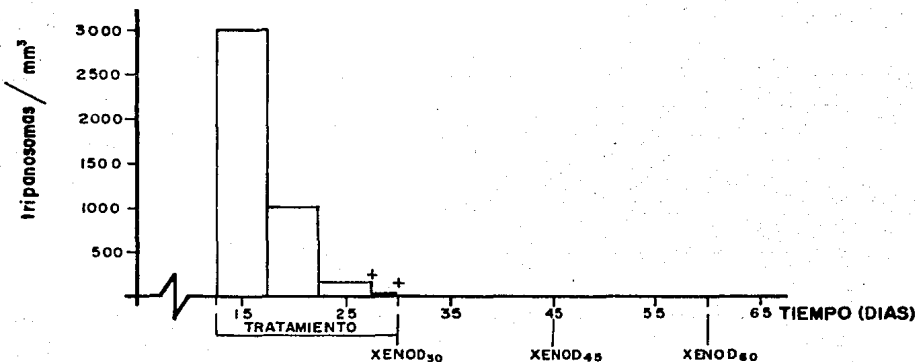


TABLA 3

LOTE C FASE CRONICA DE LA INFECCION

CEPA MIGUZ DE Trypanosoma cruzi
 tripanosomas / mm³

TRATADOS CON RADANIL ORAL 5mg/Kg/día(2 tomas)/15 días

DIAS	ratón 1	ratón 2	ratón 3	ratón 4	ratón 5	\bar{X}	s	e.s.	$\bar{X} + e.s.$	$\bar{X} - e.s.$
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
65	0	0	0	0	MUERTO	0	0	0	0	0
XENOD ₅₀	1/5	1/5	2/5	4/5						
XENOD ₆₅	1/5	0/5	0/5	0/5						
XENOD ₈₀	2/5	0/5	0/5	0/5						

CEPA CID DE Trypanosoma cruzi
 tripanosomas / mm³

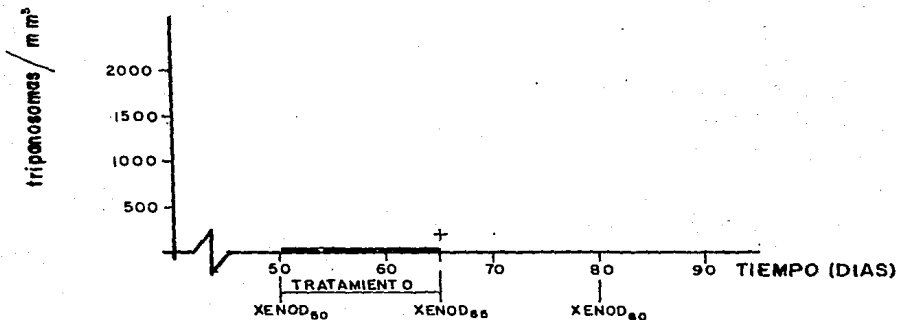
TRATADOS CON RADANIL ORAL 5mg/Kg/día(2 tomas)/15 días

DIAS	ratón 1	ratón 2	ratón 3	ratón 4	ratón 5	\bar{X}	s	e.s.	$\bar{X} + e.s.$	$\bar{X} - e.s.$
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
XENOD ₃₀	3/5	2/5	1/5	1/5	1/5					
XENOD ₄₅	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5					
XENOD ₆₀	0/5	0/5	2/5	1/5	3/5					

LOTE C FASE CRONICA

TRATAMIENTO: RADANIL ORAL
5mg/Kg/día/15 días
+ RATON MUERTO

CEPA "NIGUZ" de Trypanosoma cruzi



CEPA "CID" de Trypanosoma cruzi

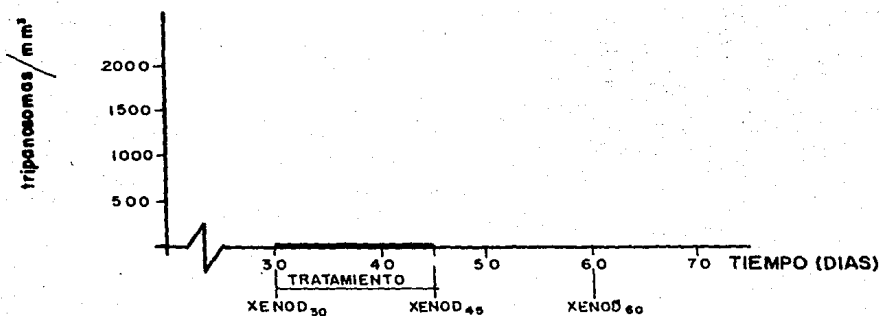


TABLA 4A

LOTE D TESTIGO *Trypanosoma cruzi*

CEPA MIGUZ DE *Trypanosoma cruzi*
 tripanosomas / mm³

SIN TRATAMIENTO

DIAS	ratón 1	ratón 2	ratón 3	ratón 4	ratón 5	\bar{X}	s	$\sigma \cdot s$	$\bar{X} + \sigma \cdot s$	$\bar{X} - \sigma \cdot s$
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	50	0	350	550	0	190	222.26	99.22	289.20	90.80
20	350	700	1550	650	300	750	450.55	201.50	951.50	548.50
25	100	450	4000	1050	500	1220	1422.88	636.33	1856.33	583.67
30	350	950	4400	750	400	1370	1531.21	648.77	2018.77	721.23
35	275	1075	550	475	400	555	275.41	123.17	678.17	431.30
40	200	450	50	50	100	170	150.33	67.23	237.23	102.77
45	50	400	0	100	25	115	146.29	65.42	180.42	49.59
50	0	150	0	500	25	135	190.79	85.32	220.32	49.68
55	0	300	25	MUERTO	0	81	126.70	56.66	137.66	24.34
60	25	400	25		25	119	162.38	72.62	191.62	46.38
65	0	125	0		0	31	54.12	24.21	55.21	6.79
70	0	0	0		0	0	0	0	0	0

TABLA 4B

LOTE D TESTIGO *Trypanosoma cruzi*

CEPA CID *Trypanosoma cruzi*

tripanosomas / mm³

SIN TRATAMIENTO

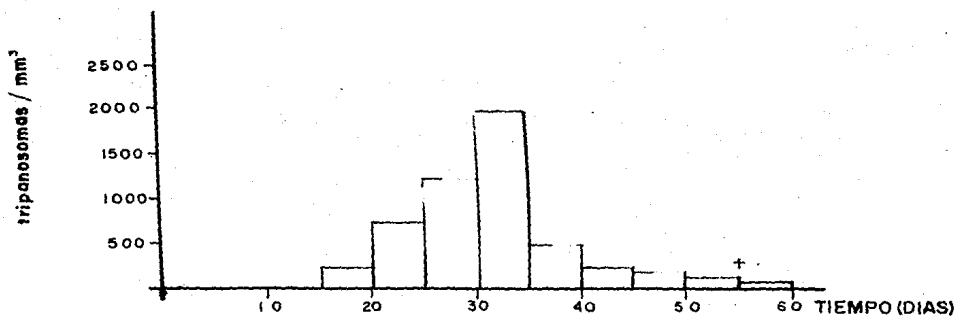
DIAS	ratón 1	ratón 2	ratón 3	ratón 4	ratón 5	\bar{x}	s	e. s	$\bar{x} + e. s$	$\bar{x} - e. s$
5	650	450	650	450	800	600	134.16	60.00	660.00	540
10	400	500	1150	550	850	690	275	122.80	812.80	467.20
15	750	8350	1000	1350	500	2394	2991.85	1337.10	3731.10	1057.10
20	150	50	0	0	0	40	58.31	26.08	66.08	13.92
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	150	0	0	50	0	40	58.31	26.08	66.08	13.92
40	425	25	150	75	150	165	138.38	61.88	226.88	103.12
45	1150	550	150	350	600	560	335.26	149.93	709.93	410.07
50	525	925	0	0	0	290	377	168.61	458.61	121.39
55	350	325	750	1150	MUERTO	644	337.44	150.70	797.65	495.85
60	250	350	650	1025		569	301.75	134.95	703.70	435.80
65	375	325	225	275		300	55.90	25.00	325.00	275.00
70	325	150	175	125		194	77.81	34.80	228.55	158.75
75	250	75	150	150		156	62.19	27.81	184.06	128.44

LOTE D TESTIGO Trypanosoma cruzi

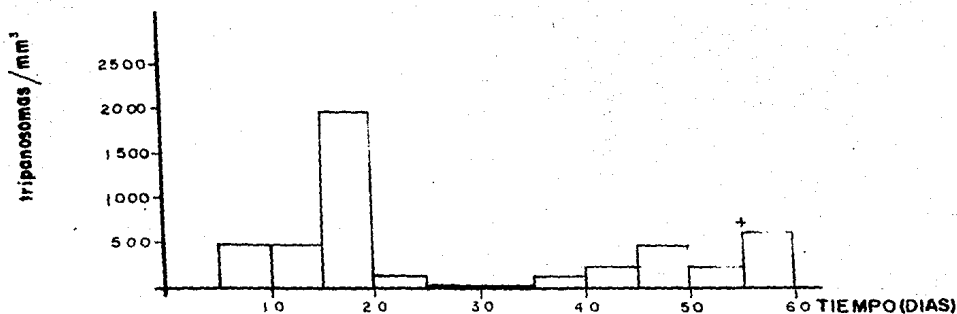
CEPA "MIGUZ"

SIN TRATAMIENTO

+ RATON MUERTO



CEPA "CID"



ta una típica curva de parasitemia con un incremento del número de tripanosomas gradual con respecto al tiempo hasta llegar a un máximo alrededor de los 30 días y una disminución gradual de número de tripanosomas.

El lote E ó "test-Radanil" muestra que tóxico resultó el medicamento, a la dosis empleada para los ratones no parasitados con Trypanosoma cruzi. Se obtuvo una mortandad del 100 % después de 15 días de tratamiento.

En el lote F ó "placebo" se administró agua destilada estéril para evaluar la técnica de administración seguida durante el estudio. En éste lote la mortandad fué de 0 %, este lote descarta la posibilidad de que las muertes ocurridas en los otros lotes no se encuentran directamente relacionadas con la técnica de administración.

Después de tres xenodiagnósticos seriados a los ratones sobrevivientes tratados se les extirpó el corazón, del cual se hizo un homogenizado que se inoculó a ratones jóvenes de la misma cepa (CD1), de los cuales se utilizaron tres ratones nuevos por cada ratón sobreviviente. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Los resultados de ratones inoculados con homogenizado de corazón de ratones tratados (tabla 6) indican la presencia ó ausencia del tripanosoma en la sangre periférica del ratón alrededor de los 15 días de inoculado la presencia se indica como "positivo" y la ausencia -

TABLA 5

LOTE E TESTIGO RADANIL

TRATADOS CON RADANIL ORAL 5mg/Kg/día(2tomas)/15 días

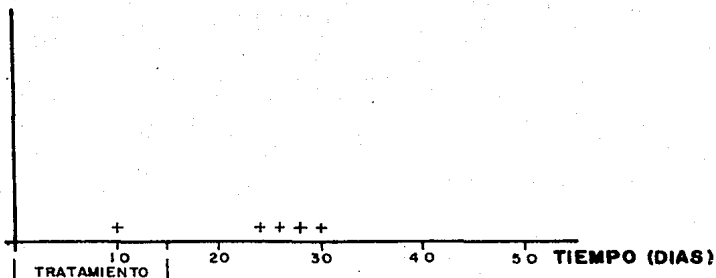
DIAS	ratón 1	ratón 2	ratón 3	ratón 4	ratón 5	\bar{X}
2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
10	0	MUERTO	0	0	0	0
12	0		0	0	0	0
14	0		0	0	0	0
16	0		0	0	0	0
18	0		0	0	0	0
20	0		0	0	0	0
22	0		0	0	0	0
24	MUERTO		0	0	0	0
26			0	MUERTO	0	0
28			MUERTO		0	0
30					MUERTO	0

LOTE F TESTIGO AGUA DESTILADA

DIAS	ratón 1	ratón 2	ratón 3	ratón 4	ratón 5	\bar{X}
1	0	0	0	0	0	0
2						
3	0	0	0	0	0	0
4						
5	0	0	0	0	0	0
6						
7	0	0	0	0	0	0
8						
9						
10	0	0	0	0	0	0
11						
12						
13	0	0	0	0	0	0
14						
15	0	0	0	0	0	0

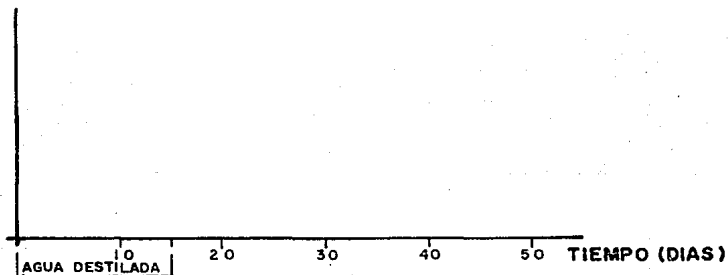
LOTE E TESTIGO RADANIL

TRATAMIENTO: RADANIL ORAL
5 mg / Kg / día / 15 días
+ RATON MUERTO



LOTE F AGUA DESTILADA

ADMINISTRACION ORAL
1.0ml. AGUA DESTILADA



como "negativo" con la técnica de analisis de gota de sangre en fresco.

En éstos resultados se observa que en la fase "aguda" de la infección producida por la cepa "MIGUZ" de - Trypanosoma cruzi el Radanil (Ro 7-1051) a la dosis em pleada mostró acción supresora contra los parásitos.

TABLA 5

LOTE E TESTIGO RADANIL

TRATADOS CON RADANIL ORAL 5mg/Kg/día(2 tomas) /15 días

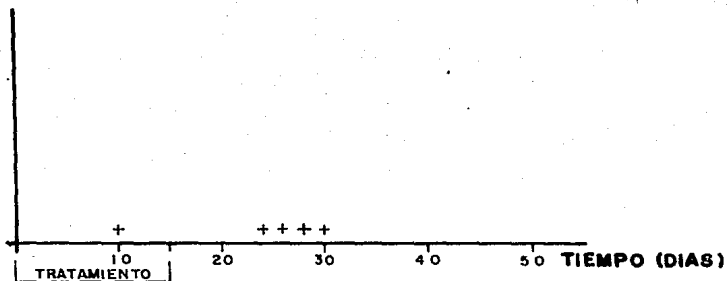
DÍAS	ratón 1	ratón 2	ratón 3	ratón 4	ratón 5	\bar{X}
2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
10	0	MUERTO	0	0	0	0
12	0		0	0	0	0
14	0		0	0	0	0
16	0		0	0	0	0
18	0		0	0	0	0
20	0		0	0	0	0
22	0		0	0	0	0
24	MUERTO		0	0	0	0
26			0	MUERTO	0	0
28			MUERTO		0	0
30					MUERTO	0

LOTE F TESTIGO AGUA DESTILADA

DÍAS	ratón 1	ratón 2	ratón 3	ratón 4	ratón 5	\bar{X}
1	0	0	0	0	0	0
2						
3	0	0	0	0	0	0
4						
5	0	0	0	0	0	0
6						
7	0	0	0	0	0	0
8						
9						
10	0	0	0	0	0	0
11						
12						
13	0	0	0	0	0	0
14						
15	0	0	0	0	0	0

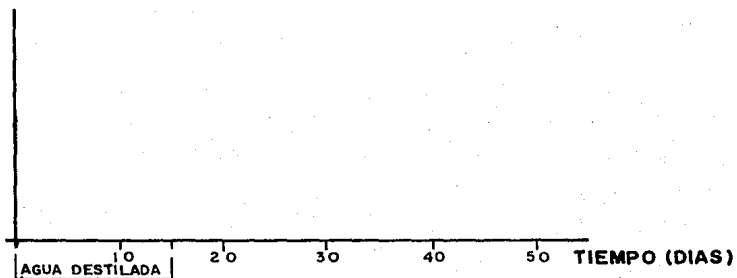
LOTE E TESTIGO RADANIL

TRATAMIENTO: RADANIL ORAL
5 mg / Kg / día / 15 días
+ RATON MUERTO



LOTE F AGUA DESTILADA

ADMINISTRACION ORAL
1.0ml. AGUA DESTILADA



como "negativo" con la técnica de análisis de gota de sangre en fresco.

En éstos resultados se observa que en la fase "aguda" de la infección producida por la cepa "MIGUZ" de - Trypanosoma cruzi el Radanil (Ro 7-1051) a la dosis empleada mostró acción supresora contra los parásitos.

TABLA 6

Ratones inoculados con homogenizado de corazon de ratones tratados

<p>CEPA MIGUZ - INICIO ratón No.</p> <p>LOTE A</p> <p>3 ————— negativo negativo negativo</p> <p>5 ————— Positivo negativo Positivo</p>	<p>CEPA CID - INICIO ratón No.</p> <p>LOTE A</p> <p>3 ————— Positivo Positivo Positivo</p>
<p>CEPA MIGUZ - AGUDO ratón No.</p> <p>LOTE B</p> <p>3 ————— negativo negativo negativo</p> <p>5 ————— negativo negativo negativo</p>	<p>CEPA CID - AGUDO ratón No.</p> <p>LOTE B</p> <p>4 ————— negativo negativo negativo</p> <p>5 ————— negativo Positivo Positivo</p>
<p>CEPA MIGUZ - CRONICO ratón No.</p> <p>LOTE C</p> <p>1 ————— negativo negativo negativo</p> <p>2 ————— negativo negativo negativo</p> <p>3 ————— negativo Positivo negativo</p>	<p>CEPA CID - CRONICO ratón No.</p> <p>LOTE C</p> <p>1 ————— Positivo negativo Positivo</p> <p>2 ————— Positivo Positivo Positivo</p> <p>3 ————— negativo negativo negativo</p>

DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS.

Los criterios de curación utilizados fueron: Conteo de tripanosomas en cámara de Neubauer, xenodiagnóstico seriado é inoculación de homogenizado de tejido. De -- ellos los más sensibles son los dos últimos (6); ya -- que requieren de una menor cantidad de parásitos para iniciar la infección, ya sea en el vector ó en el huesped experimental.

En éste trabajo el conteo de tripanosomas en cámara de Neubauer se utilizó para dos propósitos: Elaborar -- las curvas de parasitemis (lote D) y tomando como referencia éstas curvas observar el comportamiento que siguió cada cepa de Trypanosoma cruzi en las diferentes fases de la enfermedad de Chagas con el tratamiento de 5 mg./Kg/día (2 tomas orales) de Radanil (Ro 7-1051).

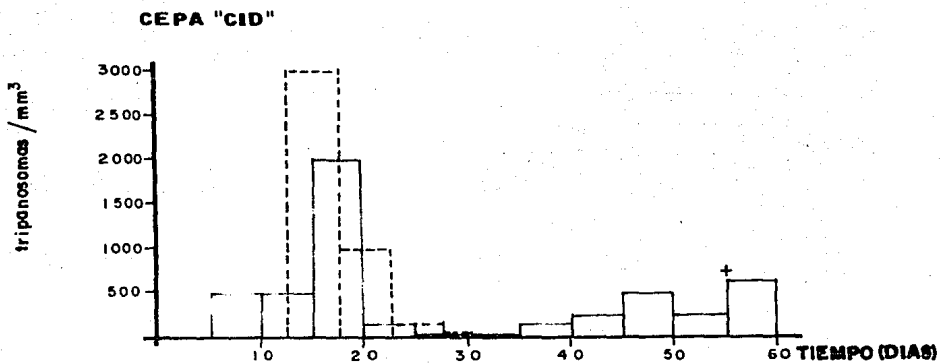
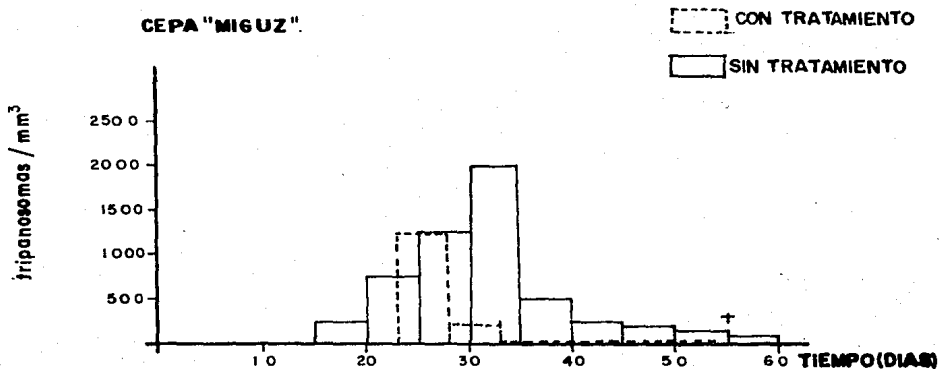
De acuerdo a lo expuesto en el párrafo anterior; en el lote A ó fase de "iniciación de la infección" en -- las dos cepas inmediatamente que se inoculó el tripanosoma se inició con el tratamiento, durante los 15 días que duró el tratamiento no se observó con ésta técnica la presencia de tripanosomas.

En el lote B ó fase "aguda" de la infección se dejó avanzar la infección en tiempos variables para cada cepa, en la cepa "MIGUZ" se inició el tratamiento a los 25 días después de la inoculación, en ésta etapa el -- promedio de la concentración de parásitos del lote se

encontró de 1,210 tripanosomas/mm³; según la curva de parasitemia, la cepa tiende a aumentar su concentración sanguínea conforme al tiempo, pero con la presencia del medicamento se observó un notable descenso del número de tripanosomas hasta no detectarse con esta técnica (gráfica 6). Para la cepa "CID" la infección se dejó avanzar a los 15 días después de la inoculación y la concentración promedio de parasitos por lote fué de 3,080 tripanosomas/mm³, con el tratamiento se observó un descenso pero no tan notable como en la cepa "MIGUZ", éste comportamiento es explicable de acuerdo al número de tripanosomas que se tienen por cepa, aunque se encuentran en fases equivalentes de la infección el número de tripanosomas para la cepa "MIGUZ" es menor en comparación con la cepa "CID" y la dosis del medicamento es la misma, podemos decir que en la cepa "CID" el medicamento no fué suficiente para abatir un número tres veces mayor de tripanosomas como se encuentran en la cepa "MIGUZ".

Para el lote C ó fase "crónica" de la infección se permitió que ésta avanzara hasta los 50 días después de la inoculación en la cepa "MIGUZ" y hasta los 30 días en la cepa "CID". La concentración de parásitos es tan baja que no se detectaron con la técnica de conteo de tripanosomas en cámara de Neubauer, por lo que durante el tratamiento no fué posible seguir el comportamiento de las cepas por medio de esta técnica,

GRAFICA COMPARATIVA



por lo tanto se utilizó el xenodiagnóstico seriado, de la siguiente manera: Antes de iniciar el tratamiento - se realizó el primero resultando positivo en todos los ratones de cada una de las cepas; inmediatamente después de terminado el tratamiento se realizó el segundo en donde se observó solo un ratón positivo para cada cepa, lo que nos indica que no se eliminaron totalmente los parásitos permaneciendo algunos capaces de infectar al vector; el tercer xenodiagnóstico se realizó a los 15 días después de terminado el tratamiento, en la cepa "MIGUZ" el único ratón que se observó positivo en el segundo xenodiagnóstico fué el que permaneció como tal, mientras que en la cepa "CID" aumentó el número de ratones positivos de 1 a 4 lo que nos muestra -- que hay más tripanosomas capaces de iniciar una infección en el vector que en la cepa "MIGUZ".

Con el lote D ó "test-parásito" se construyeron las curvas de parasitemia, como ya se había mencionado anteriormente sirvieron como base de comparación entre los lotes A, B y C que recibieron tratamiento, pues el lote D se mantuvo sin tratamiento y únicamente se le inoculó tripanosomas determinándose su concentración en sangre periférica por conteo de tripanosomas en cámara de Neubauer conforme transcurrió el tiempo en días.

Con las curvas de parasitemia podemos caracterizar el comportamiento de las cepas de Trypanosoma cruzi empleadas en el presente trabajo, "MIGUZ" y "CID" en el huesped experimental, o sea, ratones machos de la cepa

CDL. Podemos decir que la cepa "MIGUZ" tiene un comportamiento muy diferente a la cepa "CID". La cepa "MIGUZ" a los 15 días de inoculada es posible detectarla en -- sangre periférica por medio de la técnica de conteo en cámara de Neubauer y conforme transcurre el tiempo su concentración sigue en aumento gradual hasta llegar a un valor máximo a los 30 días de inoculación, después disminuye también gradualmente hasta no detectarse a -- los 70 días de inoculación. Con esto nos indica que la cepa ha invadido diferentes tejidos para continuar con su ciclo y permanecer infectando al huésped.

La cepa "CID" tiene una mayor proliferación que la cepa "MIGUZ" pues a los 5 días posteriores a la inoculación ya se encuentra en grandes concentraciones en -- el torrente sanguíneo del huésped, aumentando rápidamente su concentración del orden de 600 tripanosomas/mm³ hasta 2,394 tripanosomas/mm³ 15 días después de -- inoculada la cepa, 5 días después desciende la concentración hasta no detectarse a los 25 días de inoculada lo que nos indica que en éste período los tripanosomas se encuentran invadiendo células tisulares, haciéndose evidente nuevamente a los 35 días de inoculación.

Comparando las dos cepas, podemos decir que la cepa "CID" es más activa y más prolífica que la cepa "MIGUZ" pues requiere de menos tiempo para realizar la parte -- de su ciclo biológico que se lleva a cabo en el hues-- ped vertebrado y por lo tanto en poco tiempo invade -- una gran cantidad de células lo que hace más difícil --

su eliminación.

Los lotes E y F "test-Radanil" y "placebo" respectivamente, no fueron inoculados con Trypanosoma cruzi, - se utilizaron para observar que efecto presentaba el medicamento, así como la técnica de administración sobre el huesped experimental. Se trataron con las mismas condiciones que los otros lotes, es decir, también se les extrajo muestras de sangre en tiempos establecidos. El lote E recibió el mismo esquema posológico de prueba, mientras que el lote F recibió agua destilada estéril en igual cantidad.

Durante el tratamiento con el Radanil murió un ratón, pero 15 días después los ratones restantes también murieron, con lo que podemos decir que el Radanil es tóxico al huesped experimental cuando éste no se encuentra infectado con Trypanosoma cruzi. En el lote F los ratones permanecieron vivos durante el tiempo de experimentación, lo que nos indica que la técnica de administración empleada fué inócua para el huesped.

La técnica de homogenizado de corazón se empleó como una prueba para determinar si el Radanil en el esquema posológico de prueba actuó en el estadio de amastigote de las cepas de Trypanosoma cruzi. En el lote A ó fase de "iniciación de la infección" las dos cepas presentaron amastigotes viables capaces de infectar a nuevos huespedes. En el lote B ó fase "aguda" para la cepa "MIGUZ" los amastigotes, si existían, no fueren -

viabiles para evolucionar e infectar a nuevos ratones; en la cepa "CID" los amastigotes no se afectaron con el tratamiento y por lo tanto se presentó la infección en los huéspedes jóvenes. En el lote C los amastigotes siguieron viabiles en las dos cepas, pues se observa -- que se inicia la infección en los nuevos ratones.

CONCLUSIONES.

De acuerdo al análisis de los resultados se desprenden las siguientes conclusiones:

1.- El Radanil (Ro 7-1051) en el esquema posológico de 5 mg/Kg/día (2 tomas orales" es un medicamento que disminuye la concentración de tripanosomas sanguíneos en cepas que se comporten como la cepa "MIGUZ" de Trypanosoma cruzi. Es decir, que solamente es eficaz contra la fase aguda de la enfermedad de Chagas.

2.- En cepas que se comportan como la cepa "CID" de Trypanosoma cruzi" el esquema posológico no fué efectivo en ninguna de las fases de la infección, por lo que se hace necesario probar otros esquemas posológicos, - haciendo variar la dosis y el tiempo de duración del - tratamiento.

3.- El Radanil, en las condiciones de uso del presente trabajo resultó muy tóxico para ratones sanos de la cepa CD1, por lo tanto se deben probar otras cepas de ratones y determinar que influencia tiene el sexo, la edad ó el peso en éste huésped experimental.

4.- Para la administración a humanos debe confirmarse rápidamente el diagnóstico y dar inmediatamente el tratamiento a los casos positivos, pues además de las molestas reacciones adversas, recientemente se ha determinado que éste compuesto nitroimidazólico tiene actividad mutagénica y teratogénica (14, 21).

5.- Por ser un medicamento que disminuye la concentración de tripanosomas sanguíneos, debe emplearse en pacientes con la enfermedad de Chagas en nuestro país mientras se encuentran mejores medicamentos para tratar ésta tripanosomiasis, interrumpiendo así el ciclo biológico del parásito y disminuir su transmisión.

6.- Es necesario seguir investigando sobre la toxicidad de este medicamento para determinar la dosis a la cual se tengan efectos terapéuticos y se disminuyan los efectos secundarios.

7.- Se debe seguir investigando sobre la enfermedad de Chagas en nuestro país para determinar realmente su epidemiología, aislar y caracterizar las cepas de Trypanosoma cruzi, pues como se observó durante éste estudio cepas aisladas de la misma especie en la misma zona geográfica tienen diferente susceptibilidad y se comportan de manera diferente en el mismo huésped experimental; así se tendrá mayor conocimiento de ésta enfermedad para tomar acciones que lleven a su prevención y control para evitar que en nuestro país se convierta en un problema de salud pública como lo es en países sudamericanos.

8.- También se hace necesario estandarizar y difundir las técnicas de laboratorio, como el xenodiagnóstico, para el diagnóstico de ésta enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Adams, G.E. Toxicity of nitro compounds toward -- hypoxic mammalian cells in vitro. Journal Cancer 1980;64(3):555-560.
- 2.- Amato Neto V. Eritema polimorfo devido ao benzonidazol, no tratamento da doença de Chagas. Rev. --- Inst. Med. Trop. Sao Paulo 1980;22:93-95.
- 3.- Andrade, S. G. Influencia da cepa do Trypanosoma cruzi na resposta a terapeutica experimental pelo Bay 2502. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 1975;17(6):380-389.
- 4.- Andrade, S. G. Estudo experimental sobre a acao terapeutica da droga Ro 7-1051 na infeccao por diferentes cepas do Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1977;19(5):335-341.
- 5.- Boainain, E. Terapeutica etiologica da doença de - Chagas. Arq. Bras. Cardiol. 1979;32(6):395-399.
- 6.- Brener, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1962; 4(6):389-396.
- 7.- Brener, Z. Differences in the susceptibility of - Trypanosoma cruzi strains to active chemotherapeutic agents. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1976; 18(6):450-455.

- 8.- Castrillón, R. L. El efecto terapéutico en el ratón cepa CFW del alopurinol sobre la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas). Salud Pública de México. 1984;26(2):146-154.
- 9.- Cerisola, J. A. Chemotherapy of Chagas' infection - in man. O. P. S. Scientific Publication. 1977;(347) 35-47.
- 10.- Davidsohn, I. Diagnóstico clínico por el laboratorio. 6a. ed. Ed. Salvat. Barcelona, 1982:127-129.
- 11.- Faust, C. E. Parasitología clínica. 1a. ed. Ed. -- Salvat. Barcelona, 1977:107-117.
- 12.- Ferreira, H. Ensaio terapéutico-clínico com o benzonidazol na doença de Chagas. Rev. Inast. Med. -- Trop. Sao Paulo. 1976;18(5):357-364.
- 13.- Goldsmith, R. S. Estudios epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Oaxaca, México. Bol. Of. Sanit. Panam. 1979;87(1):1-17.
- 14.- Gutteridge, W. E. Biochemical studies of intracellular, blood and culture forms of Trypanosoma cruzi: Possible targets in rational chemotherapy. O.P. S. Scientific Publication. 1977;(347):48-58.
- 15.- Hammond, D. J. A novel series of chemical structures active "in vitro" against the trypomastigote - forms of Trypanosoma cruzi. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1984;(78):91-95.
- 16.- Hogg, J. Blood transfusion and Chagas' disease. -- Parasitology.1984;89(2):25.

- 17.- Hudson, L. Suggested guidelines for work with live Trypanosoma cruzi. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. --- Hyg. 1983;77(3):416-419.
- 18.- Kagan, I. G. Evaluación de pruebas serológicas utilizadas para estudiar la enfermedad de Chagas. --- Bol. Of. Sanit. Panam. 1979;87(4):309-317.
- 19.- Koberle, F. Patología y anatomía patológica de la enfermedad de Chagas. Bol. Of. Panam. 1961;(51):-404-428.
- 20.- Levi, G. C. Analise de manifestacoes colaterais -- devidas ao uso do medicamento Ro 7-1051, nitroimidazólico preconizado para tentativas de tratamento específico da doença de Chagas. Rev. Inst. Med. -- Trop. Sao Paulo. 1975;17(1):49-54.
- 21.- Nagel, R. Mutagenicity of 2 anti-chagasic drugs -- and their metabolic deactivation. Mutation Research. 1983;(117):237-242.
- 22.- Pifano, F.C. Evaluación de los procedimientos de laboratorio empleados en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Of. Sanit. Panam. 1960;47(6):563-571.
- 23.- Raaf laud J. Single-dose pharmacokinetics of the -- trypanosomicide benzimidazole in man. Swi. Arzneim. Forsch. 1979;29(10):1611-1614.
- 24.- Raaf laud, J. Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benzimidazole in man. Swi. Arzneim. Forsch. 1980;30(12):2192-2194.

- 25.- Salazar, P. M. Dos nuevas localizaciones de transmisores de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Salud Pública de México. 1983;25:77-82.
- 26.- Schenone, H. Valor do xenodiagnóstico na avaliação do tratamento da infecção crônica pelo Trypanosoma cruzi. Rev. Goiana Med. 1970(16):179-184.
- 27.- Spiegel, M. Estadística. 1a. ed. Ed. Mc Graw Hill México, 1981.
- 28.- Tay, J. La enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Salud Pública de México. 1980;22(4):409-450.
- 29.- Tay, J. Evolución del Trypanosoma cruzi. Salud Pública de México. 1980;22(5):513-520.
- 30.- Wayne, D. Bioestadística. 1a. ed. Ed. Limusa. México. 1979.