



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluación in vivo de la susceptibilidad de cuatro
cepas mexicanas de Trypanosoma cruzi a dos
fármacos: Radanil y Lampit.**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

Licenciado en Biología

Presenta:

Ma. Teresa Padilla Alcántara



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

Resumen general	1
Introducción	2

PRIMERA PARTE

Revisión de la literatura sobre varios aspectos de <u>T. cruzi</u>	
A. Biología del parásito	4
B. Patología	7
C. Metabolismo de <u>T. cruzi</u>	9
D. Mecanismo de acción de Lampit y Radanil	13
E. Antecedentes de estudios similares	15

SEGUNDA PARTE

Sección Experimental

A. Objetivos	17
B. Material y Método	17
C. Desarrollo experimental	22
D. Resultados	24
E. Discusión	29
F. Conclusiones	36
Bibliografía	38

RESUMEN GENERAL

Para investigar las diferencias en la susceptibilidad de T. cruzi a agentes quimioterapéuticos activos, grupos de ratones - (Mus musculus) cepa (NIH), fueron inoculados con cuatro cepas mexicanas de T. cruzi posteriormente se les aplicaron dos fármacos, en el tiempo de máxima parasitemia, un nitrofurano y un nitroimidazol cuyos nombres comerciales son: Lampit y Radanil respectivamente, así mismo se trabajó con las clonas de estas cepas siguiendo la misma metodología.

El criterio de susceptibilidad de cada cepa así como el de la clona se basó en repetidos exámenes de sangre fresca (Método de Pizzi), observándose que en algunos casos la parasitemia disminuía.

Las evidencias apoyan marcadas diferencias en la susceptibilidad de algunas cepas y clonas a las drogas activas. Estas diferencias han sido detectadas para los dos fármacos y parecen relacionarse a características biológicas de las cepas más que al modo específico de acción de las drogas usadas.

INTRODUCCION

La Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una zoonosis cuyo agente etiológico es Trypanosoma cruzi. Existe en todos los países americanos con excepción de Canadá y Alaska, constituyendo uno de los problemas de salud pública más graves de América Latina debido a su amplia distribución geográfica, elevada morbilidad (especialmente en la forma cardíaca), alta mortalidad en ciertas regiones, su historia natural compleja y las considerables dificultades técnicas y operativas para el establecimiento de medidas de control (Avila, 1983).

Se estima que al menos 15-20 millones de personas en áreas urbanas y rurales de América Latina están infectadas con este parásito y con el riesgo de desarrollar la fase crónica de la enfermedad. México se considera como un país endémico para este padecimiento (Tay, 1980). Se propone que sea considerado como un problema de salud pública para nuestro pueblo (Velasco, 1986).

El parásito es transmitido al hombre por diferentes especies de insectos triatóminos hematófagos, de las cuales hay más de cien en el Continente Americano; 36 de éstas están asociadas a la vivienda del hombre y son fuente natural de infección.

Existen varios ciclos vector-huésped en la transmisión de T. cruzi: doméstico, semidoméstico y selvático. La transmisión

también ocurre por una infección congénita o por transfusión de sangre; esta última, se ha incrementado en forma importante en las grandes ciudades.

Esta enfermedad fue originalmente una zoonosis asociada con mamíferos selváticos. Las condiciones de vivienda humana, tales como techos de palma, paredes resquebrajadas o expuestas al medio etc., sobre todo en áreas rurales, son lugares ideales para que se críen y sobrevivan los insectos transmisores de esta enfermedad (Moncayo, 1986).

PRIMERA PARTE

Revisión de la literatura sobre varios aspectos de T. cruzi.

Posición taxonómica que guarda Trypanosoma cruzi

Reino	Animal
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastogophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Supér orden	Parabasalidea
Orden	Kinetoplástida
Suborden	Trypanosomatina
Género	<u>Trypanosoma</u>
Especie	<u>T. cruzi</u>

tomado de Levine et al., 1980

A. Biología del parásito.- Trypanosoma cruzi, es un protozoario flagelado perteneciente a la familia Trypanosomatidae. Como todos los protozoarios de esta familia, T. cruzi posee una estructura celular característica, el cinetoplasto, constituido por ADN y una doble membrana mitocondrial que lo envuelve y se extiende a toda la célula constituyendo de esa manera una mito--

condria gigante única (Schmidt, 1981).

Durante su ciclo de vida, T. cruzi presenta varias formas que pueden ser vistas fácilmente al microscopio óptico. La definición de éstas formas se basa en: 1) la forma general de la célula; 2) la posición del cinetoplasto con relación al núcleo y 3) la región donde emerge el flagelo a partir de la bolsa flagelar (Hoare, 1966).

De acuerdo con este criterio, las siguientes formas pueden ser identificadas:

- a) Amastigote.- Sin flagelo protuberante, son organismos de forma esférica u ovalada; se reproducen intracelularmente en el huésped vertebrado por fisión binaria; presenta un cinetoplasto en forma de bastoncillo y un núcleo grande.
- b) Epimastigote.- Presentan el cinetoplasto en posición anterior cerca del núcleo y un flagelo que al principio lo contornea una pequeña membrana ondulante; son organismos fusiformes, que se multiplican en el tubo digestivo del vector y en medios de cultivo.

También se localizan dentro de las células del vertebrado durante el final del ciclo intracelular cuando los amastigotes se transforman en tripomastigotes o visceversa, en el comienzo de un nuevo ciclo (De Souza, 1984).

c) Tripomastogote.- provistos de un cinetoplasto situado detrás del núcleo y un flagelo, así como una membrana ondulante a lo largo del organismo; representa una forma infectante no multiplicativa del parásito.

- Tripomastigote sanguíneo.- se encuentra en la sangre del hospedero vertebrado y constituyen la fase infectante para los triatóminos, cuando éstos ingieren sangre de un hospedero infectado.

- Tripomastigote metacíclico.- aparece en la luz del intestino del insecto transmisor, (Reduviidae, Triatominae) y representan la fase infectante para los huéspedes vertebrados (Sánchez, 1987).

Transmisión.- los triatóminos se infectan al ingerir tripomastigotes de la sangre periférica de mamíferos infectados.

En la luz del mesogastrio de los insectos, los organismos se multiplican asexualmente en forma de epimastigotes y, después de un período de 15 a 30 días, su proliferación conduce a la formación de tripomastigotes metacíclicos en el recto del insecto. Estas formas infecciosas se expulsan con las heces del triatómino y los tripomastigotes inician la infección en nuevos huéspedes al penetrar por las abrasiones de la piel o por las membranas mucosas. Esta transmisión se denomina "de estación posterior" o "por contaminación". En la tripanosomiasis africana las formas infecciosas están asociadas a las partes bucales

del insecto vector y se introducen a los nuevos huéspedes por -- la picadura de ese insecto ("de estación anterior" o transmisión "por inoculación").

Los tripanosomas infectantes del insecto penetran en las células y se multiplican en forma de amastigotes formando los denominados seudoquistes, que son células repletas de amastigotes.

Posteriormente los amastigotes se transforman en tripomastigotes y, al romperse las células, quedan libres para invadir - - otras células o para ser ingeridos por un insecto (Alarcón, S. - 1976).

B. Patología.- La entrada de los tripomastigotes metací-- clicos produce una reacción inflamatoria aguda local. En una o dos semanas se diseminan a los ganglios linfáticos regionales y se empiezan a multiplicar en las células que los fagocitan. Los amastigotes intracelulares efectúan repetidas divisiones formando grandes cantidades de parásitos que producen los llamados seudoquistes. Después de unos días, algunos de los microorganismos se transforman en tripomastigotes y salen del seudoquiste destruyendo la célula que los contiene. Entonces ocurre una parasitemia generalizada y casi cualquier tipo de tejido puede ser invadido, aunque el parásito muestra marcada preferencia por los músculos y células nerviosas. En las células recién invadidas, se repite nuevamente el cambio a amastigote, formación del seudo- - quiste, transformación a tripomastigotes y ruptura del seudoquis

te. Esta ruptura se acompaña de una respuesta inflamatoria local aguda con degeneración y necrosis de las células nerviosas de las regiones vecinas, especialmente células ganglionares. Este es el cambio patológico más importante de la Enfermedad de Chagas, cuyo mecanismo no se conoce bien, sin embargo, se ha atribuido a la liberación de toxinas en el momento de la ruptura de los pseudoquistes y a la destrucción de los amastigotes restantes.

La Enfermedad de Chagas presenta un período agudo y uno crónico. El período agudo se inicia con la entrada en la piel de los tripomastigotes contenidas en las heces de las chinches. La inflamación local produce un pequeño nódulo rojo conocido como chagoma, con edema de los nódulos linfáticos regionales. En aproximadamente el 50% de los casos los tripomastigotes penetran por la conjuntiva del ocular produciendo edema palpebral y de la conjuntiva, así como hinchazón de los ganglios linfáticos y preauriculares, estos síntomas se conocen como Signo de Romana. Al progresar la fase aguda de la enfermedad, se pueden encontrar pseudoquistes en casi cualquier órgano del cuerpo aunque la intensidad en el ataque varía de unos a otros. Generalmente es invadido el músculo cardiaco con la pérdida de casi el 80% de las células ganglionares cardiacas. Entre los síntomas de la fase aguda se incluyen anemia, pérdida de fuerza, disturbios nerviosos, escalofríos, dolores de huesos y músculos, así como algunos trastornos cardiacos. La muerte suele presentarse de 3 a 4 semanas después de la infección. La fase aguda es más co--

mún y grave entre los niños menores de 5 años de edad.

La fase crónica se ve con más frecuencia en adultos. Su espectro de síntomas es debido principalmente a la disfunción nerviosa central y periférica la cual puede llegar a durar muchos años. Algunos pacientes pueden estar virtualmente asintomáticos y repentinamente morir por paro cardiaco. En las áreas endémicas de México la Enfermedad de Chagas produce alrededor del 70% de las muertes por paro cardiaco en los adultos jóvenes. Parte de la insuficiencia de la función cardiaca es producida por la pérdida del tono muscular como consecuencia de la destrucción de los ganglios nerviosos. El corazón crece mucho y se hace flácido. En algunas regiones de Sudamérica es común que se destruyan los ganglios autónomos del esófago y del colon. Esto altera el tono muscular, dando como resultado alteración del peristaltismo y la gradual flacidez del órgano, el cual aumenta su diámetro y es incapaz de pasar material. A estas condiciones avanzadas se les denomina megaesófago o megacolon respectivamente.

El megaesófago avanzado es mortal cuando el paciente no puede deglutir. Se ha demostrado en forma experimental que los túbulos testiculares y el epidídimo se atrofian en la Enfermedad de Chagas crónica (Schmidt, 1981).

C. Metabolismo de T. cruzi.- La bioquímica de este protozoario implica procesos comunes a otros eucariotes:

- a) Transporte, asimilación, biosíntesis y degradación de moléculas orgánicas (glúcidos, ácidos grasos, esteroides y aminoácidos).
- b) Biosíntesis y degradación de moléculas de DNA, RNA, proteínas y polisacáridos).
- c) Transporte de iones.
- d) Generación y utilización de energía (fermentación, respiración, formación y utilización para el movimiento).
- e) Regulación metabólica, diferenciación y multiplicación.

Estudios de bioquímica comparada, han demostrado que las estructuras moleculares de T. cruzi y sus reacciones metabólicas son similares en general a los establecidos con los organismos más utilizados para la investigación bioquímica como son: levaduras, bacterias y algunos vertebrados. Sin embargo, algunos procesos metabólicos se han modificado como consecuencia de la adaptación de T. cruzi a la vida parasitaria. Entre estas modificaciones se deben mencionar:

- a) la incapacidad para sintetizar bases púricas y pirimídicas.
- b) la incapacidad para sintetizar porfirinas.
- c) bajo contenido de peroxidasa.
- d) ausencia de catalasa.

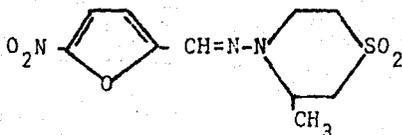
- e) bajo contenido de citocromo "C" oxidasa.
- f) operación restringida del Ciclo de Krebs.
- g) alta capacidad para fermentar la glucosa en presencia de oxígeno, con la formación de ácidos orgánicos.
- h) ausencia de xantina oxidasa y ribonucleasa. (Gutteridge, - 1981; Stoppani, 1983).

Quimioterapia.- Se conoce actualmente que el tratamiento de la Enfermedad de Chagas es todavía un problema no resuelto y entre los programas de investigación de las organizaciones de los países más afectados y de los organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud, destaca la búsqueda de nuevos medicamentos contra la Enfermedad de Chagas (Turrens, - 1986). Entre estos medicamentos sobresalen dos sustancias nitrroeterocíclicas, el Nifurtimox (un nitrofurano y el Benznidazol (un nitroimidazol). Las dos drogas son activas por vía oral, ninguna ha mostrado originar resistencia adquirida y ambas han producido alguna cura parasitológica. Sin embargo, el porcentaje de cura es menor en los casos crónicos que en los agudos y ambos tipos varían de estudio a estudio y de un área geográfica a otra (W.H.O., 1981).

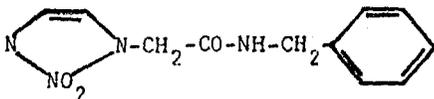
En México se están utilizando estos dos fármacos para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas, por lo cual consideramos necesario conocer el efecto que tiene sobre las cepas de T. cruzi aisladas en nuestro país, investigación aún no realizada.

Los medicamentos mencionados son los siguientes:

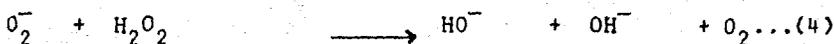
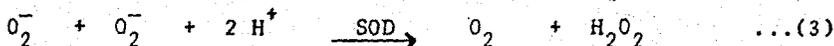
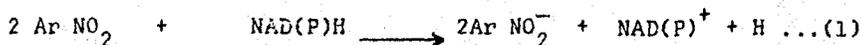
Nifurtimox (Bayer 2502, Lampit).- Los compuesto nitrofuránicos fueron ensayados desde 1952; dentro de estos nitrofuranos el Nifurtimox mostró ser el más indicado para el tratamiento de la infección chagásica. Químicamente, Nifurtimox es un 3-metil-4 (5'-nitrofurfurilideno-amino)-tetrahidro-4H-1,4-thiazine-1,1-dioxido, 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 (Boainain, 1979).



Benznidazol (RO 7-1051, Rochagan, Radanil).- Esta sustancia fue sintetizada por el departamento de Fesquisas de los laboratorios Roche y los primeros resultados en terapéutica experimental fueron comunicados en 1973, en el XII Congreso Internacional de Terapéutica, en Ginebra. Químicamente, el Benznidazol es N-bensil-2-nitro-1-imidazolacetamida. Preparado y presentado en comprimidos conteniendo 100 mg. de sustancia activa (Boainain, 1979).



D. Mecanismo de acción de Lampit y Radanil.- 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. Los productos resultantes de esa reducción son fácilmente oxidados, con formación de radicales libres, algunos de ellos frecuentemente tóxicos. Los trabajos de Stoppani (1979) 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 (NAD(P)H) al grupo nitro (reacción 1). La formación del radical nitro se demuestra por espectroscopía de resonancia paramagnética. El segundo paso consiste en la transferencia del electrón libre al oxígeno regenerando al Nifurtimox y formando el anión superóxido (O_2^-) (reacción 2).



El O_2^- dismuta a H_2O_2 de manera espontánea o por la acción de la superóxido dismutasa (SOD reacción 3). Por último, la reacción 4 catalizada por hierro produce el radical hidroxilo (HO^-). Se considera que el radical hidroxilo es muy tóxico. Las reacciones 1-4 se pueden demostrar en todas las formas de

T. cruzi (epi, tripo y amastigote), células enteras, homogene-- dos, fracciones mitocondriales y microsomales, utilizando méto-- dos bioquímicos adecuados tales como las reacciones del adeno-- cromo y del citocromo C, para el anión superóxido, y la reac-- ción de la peroxidasa para el agua oxigenada. Estas reacciones no son privativas del parásito pues extractos de tejido de mamí-- fero (hígado, riñón, miocardio, testículo) en presencia de - - NAD(P), Nifurtimox o Benznidazol, generan anión superóxido y pe-- róxido de hidrógeno. El Benznidazol debe ser empleado en con-- centraciones mayores que el Nifurtimox para alcanzar efectos - iguales en pruebas in vivo lo que resulta sorprendente si se - tiene en cuenta la capacidad del Benznidazol para producir, por una parte la formación de peróxido en el huésped, y por la otra, su acción sobre T. cruzi. Al parecer podrían ser los productos de degradación del Benznidazol los que generen los radicales li-- bres (W.H.O., 1986).

Los productos de la reducción parcial del oxígeno, son tó-- xicos tanto para T. cruzi como para el huésped mamífero. El - H_2O_2 es capaz de actuar como oxidante y como reductor de hemo-- proteínas y de moléculas que contienen grupos tioles y el O_2^- es reductor y oxidante, participando como O_2H 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 =CH- de los áci-- dos grasos insaturados y en esa forma inicia una cadena de reac-- ciones de peroxidación que generan aldehidos de menor peso mole

cular, entre otros el dialdehído malónico (Stoppani, 1983).

E. Antecedentes de estudios similares.- Brener (1971) fue el primero en investigar la susceptibilidad de las formas circulantes de T. cruzi en la sangre a los compuestos activos, el autor basó su método 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 a los tejidos del hospedero (Brener, 1969). Los ratones experimentales fueron inoculados intravenosamente con la cepa MR 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 los estados de los parásitos.

Brener en 1984 fue el primero en descubrir un método que permite determinar in vivo y en un corto tiempo (4-6 horas) la sensibilidad de cepas de T. cruzi a diferentes agentes quimioterapéuticos. Usando cepas resistentes y sensibles a los medicamentos es posible observar una buena correlación entre los resultados obtenidos con el método rápido (el cual detecta la actividad de las drogas contra formas circulantes en la sangre) y aquellos obtenidos con esquemas de acción prolongada que envuelve una administración de la droga por 20 días consecutivos y un período prolongado de asistencia a los animales. El método rápido puede ser usado para caracterizar la sensibilidad de cepas de T. cruzi a drogas activas usadas clínicamente para fortalecer infor

mación específica sobre una acción parasiticida en tripomastigotes sanguíneos y eventualmente para lograr nuevos compuestos.

SEGUNDA PARTE

Sección Experimental

A. Objetivos.

1. Evaluar la susceptibilidad in vivo de cuatro cepas mexicanas de Trypanosoma cruzi a los fármacos Radanil y Lampit.
2. Adecuar un método rápido a las condiciones de nuestro laboratorio para evaluar la susceptibilidad in vivo de Trypanosoma cruzi a diferentes fármacos.

B. Material y Método. CEPAS DE Trypanosoma cruzi UTILIZADAS.- Las cepas MIGUZ, CID y NINOA, se aislaron de casos humanos en el Estado de Oaxaca por xenodiagnóstico; la cepa ZAACHILA fue aislada de las deyecciones de un triatoma colectado en una casa habitación en Zaachila, Oaxaca.

Todas las cepas fueron mantenidas en ratones por pases repetidos de sangre de ratón a ratón de la siguiente manera:

- se eligió uno de los ratones con gran cantidad de hemoflagelados.
- se hizo un corte en la vena caudal, de aquí se tomó sangre con una jeringa que contenía solución salina .85%, esto con el fin de evitar la coagulación.

- se homogenizó moviendo mecánicamente la jeringa de un lado a otro.
- se inyectó a los ratones sanos en la región peritoneal 0.2 ml. de la solución.

Esto se hizo cada 20 o 25 días para asegurar que los tripomastigotes se encontraran en sangre periférica.

Las clonas de las cepas MIGUZ, CID, NINOA fueron donadas por la profesora Guadalupe Castañón G. del Departamento de Parasitología de la ENCB-IPN.

ANIMALES DE EXPERIMENTACION.- Ratones blancos (Mus musculus), cepa NIH, hembras, de peso exacto entre 18 y 20 gramos.

Lotes.- Cada lote consistió de 12 ratones 5 de los cuales se ocuparon para probar las diferentes dosis del fármaco Madanil y los otros 5 de igual manera para el Lampit. Los dos ratones restantes fueron mantenidos bajo las mismas condiciones ya que fueron los testigos. Para cada cepa se utilizaron 4 lotes. Los resultados obtenidos de cada lote se promediaron para obtener un dato representativo.

EVALUACION DE LA PARASITEMIA:

A) Conteo en 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 0.2.
- 3) Aforar con cloruro de amonio al 0.85% hasta la marca 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).

B) Conteo por la técnica de Pizzi (modificada).

- 1) Obtener 5mm^3 a partir de la vena caudal de ratón infectado.
- 2) Depositar el volumen de sangre en un portaobjetos perfectamente limpio, evitando extender la gota.
- 3) Colocar un cubreobjetos del No. 1 y 22 x 22.
- 4) Esperar un minuto hasta la homogenización de la preparación.
- 5) Contar 20 campos microscópicos, utilizando el objetivo de - 40 x.
- 6) Calcular el factor de conversión a número de tripomastigote por 5mm^3 .
- 7) Multiplicar el factor por el número total de tripomastigotes contados en 20 campos. Reportar como tripomastigotes - en 5mm^3 .

CALCULO DEL FACTOR DE CONVERSION

Método semicuatitativo de Pizzi (modificado).

- 1) Se utilizó un ocular de 10 X; un objetivo de 40 X; el radio

de objetivo fue de 90 micras.

- 2) Se obtuvo el área del círculo.
- 3) Se obtuvo el área del cuadrado.
- 4) Se obtuvo el área del cubreobjetos (22 x 22).
- 5) Se dividió el número de campos microscópicos (área del cubreobjetos) entre el área del cuadrado.
- 6) Se dividió el número de campos microscópicos (área del cubreobjetos) entre el área del círculo.
- 7) Se sumaron los resultados de las dos divisiones anteriores y se dividió entre dos para sacar un promedio.
- 8) Este promedio se dividió entre el número de campos microscópicos contados en total (20).
- 9) El valor obtenido fue el del factor de conversión y se multiplica por el número total de tripomastigotes contados en los 20 campos. Se reporta como número de tripomastigotes en 5mm^3 .

CURVAS DE PARASITEMIA.- Se inoculó con 10,000 tripomastigotes sanguíneos un lote de 5 ratones, evaluándose la parasitemia con la Cámara de Neubauer a partir del 5o. día posterior a la inoculación y hasta que desaparecieron de la corriente sanguínea, esto se hace para cada cepa.

APLICACION DEL MEDICAMENTO.- Los ratones fueron tratados con una suspensión acuosa del medicamento (a la concentración deseada) por vía oral, con ayuda de una jeringa de 1 ml. cuya aguja fue despuntada para prevenir lesiones. Para evitar erro-

res en las lecturas por causas diferentes a la acción de los com
puestos químicos probados, a los ratones testigos se les administró
tró agua como placebo.

DROGAS USADAS:

- Nifurtimox; Bayer 2502; Lampit.
- Benznidazol; RO 7-1051; Rochagan; Radanil.

CALCULO DE LAS DOSIS ADMINISTRADAS:

Radanil.- Comprimidos de 240 g. al 4.6% de pureza que se -
maceraron para facilitar la suspensión en agua y para poder pe--
sar la cantidad necesaria para cada dosis. Por ejemplo:

A un ratón de 25 g. se le administró una dosis de 500mg/kg
de peso. Se pesaron 3.0 gramos del comprimido y se suspendieron
en 10 ml de agua, administrando 1 ml a cada ratón.

Lampit.- Comprimidos de 400 g. al 30% de pureza se macera-
ron para facilitar la suspensión en agua y pesar la cantidad ne-
cesaria para cada dosis. Por ejemplo:

A un ratón de 25 g. se le administró una dosis de 500mg/kg
de peso. Se pesaron 4.2 g. del comprimido y se suspendieron en
10 ml de agua, administrando 1 ml a cada ratón.

C. Desarrollo Experimental:

1. A partir de ratones infectados con T. cruzi, en los cuales se mantuvieron a las cepas del protozoario en el laboratorio se inocularon grupos de cinco ratones (por cepa) con el fin de construir una curva de la parasitemia.
2. Con los ratones inoculados con el parásito se formaron lotes de seis animales por cada medicamento, uno de los cuales fungió como testigo.
3. Se realizó una suspensión de los fármacos en 1 ml de agua a las concentraciones del agente activo, previamente calculadas.
4. El día de máxima parasitemia se administraron los medicamentos a los lotes de ratones por vía oral, a los ratones testigos se les administró un placebo (agua).
5. Momentos antes de la aplicación de los medicamentos, se de--terminó el número de tripomastigotes por 5mm^3 de sangre, por el método de Pizzi. Asimismo se prosiguió el conteo a las 2, 4, 6 y 8 horas posterior a la administración del fármaco.
6. El procedimiento se repitió 4 veces para cada cepa de T. cruzi.
7. Al término del experimento se sacrificaron los ratones.

DIAGRAMA DE FLUJO

Mantenimiento de las cepas y clonas
en ratones (*Mus musculus*) cepa NIH

↓
Curvas de parasitemia

↓
Ratones con parasitemia máxima

↓
Cuenta de parasitemia por la técnica
de Pizzi (modificada)

↓
Tratamiento / elección del fármaco
 / elección de la dosis

↓
Evaluación de la parasitemia a:

t = 0, 2, 4, 6 y 8 horas

D. Resultados

Las curvas de los valores de las parasitemias obtenidas para las distintas cepas de T. cruzi, utilizadas, se presenta en la gráfica 4. A pesar de tener diferencias marcadas en el comportamiento de cada cepa el pico máximo de parasitemia de las 4 se presentó semejante en el día 22 post-inoculación.

El efecto que ejercieron los medicamentos sobre la infección, evaluados por el método rápido de Brener, se resumen en las tablas anexas.

La cepa MIGUZ no fue sensible al tratamiento con Radanil ni con Lampit, en las concentraciones y tiempos probados. El mismo resultado se presentó con las cepas CID y NINOA.

La cepa ZAACHILA fue la única de las cepas estudiadas que resultó sensible al tratamiento. Tanto el Radanil como el Lampit mostraron una acción parasiticida, provocando la reducción de la parasitemia a dosis mayores de 500 mg/kg, siendo el Radanil ligeramente más efectivo que el Lampit.

Dado que las cepas MIGUZ, CID y NINOA no lograron una reducción aparente de la parasitemia, se decidió probar una clona proveniente de cada cepa. La clona CID-1 resultó sensible a dosis de 250 mg/kg de Lampit. Con Radanil no se obtuvo una reducción aparente de la parasitemia con ninguna de las dosis proba-

das.

A dosis de 100 mg/kg la parasitemia casi se elimina a las 8 horas post-tratamiento.

La clona MIGUZ-1 al igual que la cepa que la origina es resistente a los tripanomicidas, a las dosis evaluadas. La clona NINOA-1 disminuyó al rededor del 50% su parasitemia a dosis de 750 y 1000 mg/kg, para ambos compuestos químicos.

Los animales utilizados se sacrificaron un día después de haberse utilizado en los experimentos. Todos mostraron una parasitemia abundante antes de su muerte.

No. del experimento	Droga	Dosis mg/kg	Disminución de la parasitemia (%)					
			t= 0	2	4	6	8	hrs.
1	R A D A N I L	500	0	0	70	90	99	
2		750	0	30	80	99	100	
3		1000	0	30	80	99	100	
1	L A M P I T	500	0	0	60	80	99	
2		750	0	30	80	99	100	
3		1000	0	30	80	99	100	

Tabla No. 1 Resultados obtenidos por el método rápido de tratamiento con Radanil y Lampit, aplicados a ratones infectados con la cepa ZAACHILA de T. cruzi. Con una parasitemia inicial de 2122 - tripomastigotes/5mm³ para los ratones de tratamiento con Radanil y de 3183 tripomastigotes/5mm³ para los tratados con Lampit. Sin efectos positivos a dosis de 125 y 250 mg/kg.

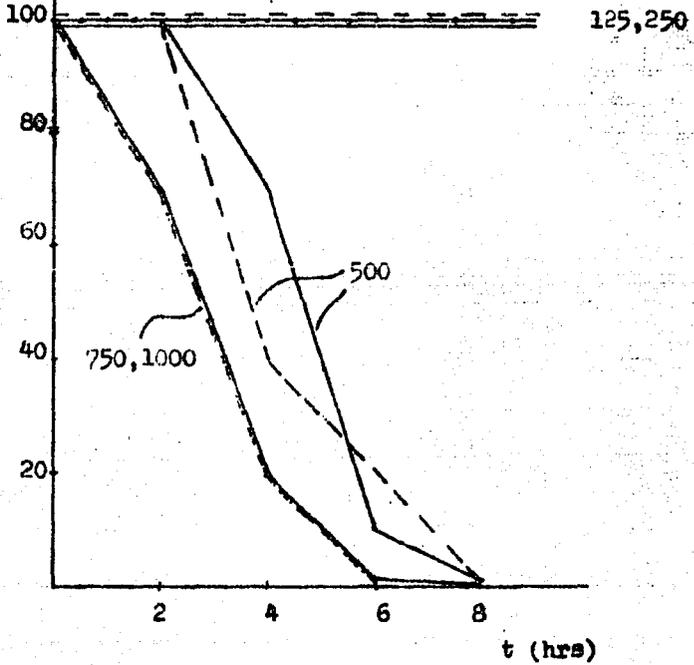
Gráfica 1

cepa: ZAACHILA

Dosis (mg/kg): 125, 250, 500, 750, 1000

Control —●—●—●—
Lampit - - - - -
Redenil ————

Parasitemia (%)
(mm³)



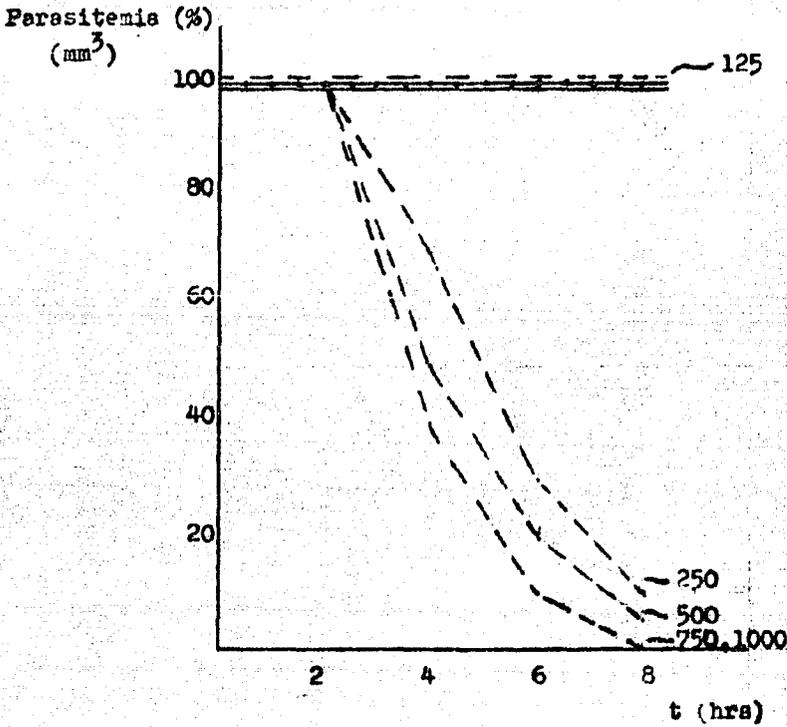
No. del experimento	Droga	Dosis mg/kg	Disminución de la parasitemia (%)					
			t= 0	2	4	6	8	hrs.
1	L	125	0	0	0	0	0	"
2	A	250	0	0	30	70	90	
3	M	500	0	0	50	80	95	
4	E	750	0	0	60	90	100	
5	"	1000	0	0	60	90	100	

Tabla No. 2 Resultados obtenidos por el método rápido de tratamiento con Radanil y Lampit, aplicados a ratones infectados con la clona CID-1 de T. cruzi. Con Radanil no se obtuvieron efectos positivos. La parasitemia inicial fue de 2122 tripomastigotes/5mm³.

Gráfico 2
clona: CID-1

Dosis(mg/kg): 125, 250, 500, 750, 1000.

Control —————
Lampit - - - - -
Radanil —————

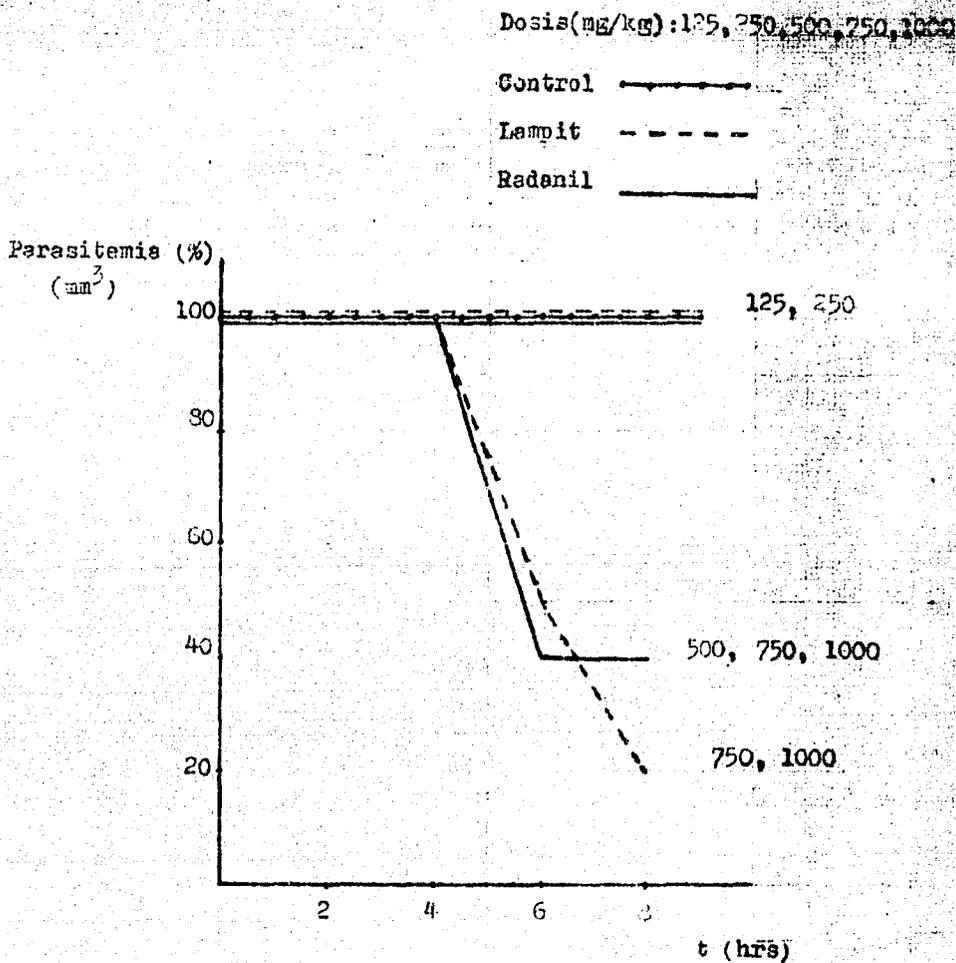


No. del experimento	Droga	Dosis mg/kg	Disminución de la parasitemia (%)					
			t= 0	2	4	6	8	hrs.
1	R A D A N I L	500	0	0	0	60	60	
2		750	0	0	0	60	60	
3		1000	0	0	0	60	60	
1	L A M P I T	500	0	0	0	0	0	
2		750	0	0	0	50	80	
3		1000	0	0	0	50	80	

Tabla No. 3 Resultados obtenidos por el método rápido de tratamiento con Radanil y Lampit, aplicados a ratones infectados con la clona NINOA-1 de T. cruzi. Con una parasitemia inicial de - 3183 tripomastigotes/5mm³. Sin efectos positivos a dosis de 25 y 250 mg/kg.

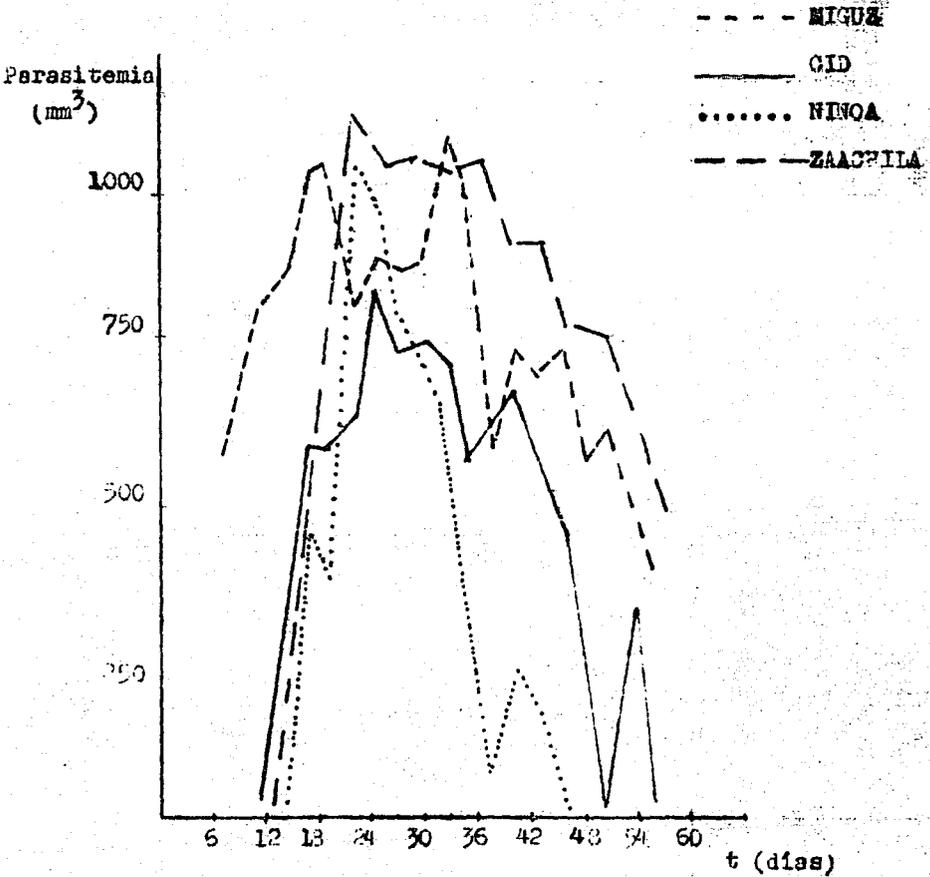
Gráfica 3

clona: NINOA-1



Gráfica 4

Curvas de parasitemia de cuatro cepas mexicanas de T. cruzi, inoculadas en ratones Mus musculus cepa NIH. Inóculo 1×10^6 tripomastigotes.



E. Discusión

Con base en el análisis de las gráficas obtenidas del comportamiento de la parasitemia de las cepas ensayadas, se escogió el período entre 22-24 días para efectuar las pruebas, pues en éste las cepas presentaban parasitemias elevadas, comparables en su pico máximo y en algunos casos este pico coincidía con los días seleccionados.

Debido al número tan alto de ratones utilizados en el ensayo (40 por cepa), la cuenta de la parasitemia se presentaba como un problema si se hubiese realizado por la técnica de la Cámara de Neubauer. Esta metodología es exacta y precisa pero se invierte mucho tiempo y sangre del animal en el llenado de la pipeta de Thoma, por lo que solo se empleó en la construcción de las curvas de parasitemia. En la evaluación de la susceptibilidad a los fármacos se siguió la técnica propuesta por Pizzi (1957) con algunas modificaciones como son:

- a) El volumen (5mm^3) se midió con pipeta automática con punta de plástico, en lugar de pipeta de vidrio. Esto agiliza el procedimiento, disminuye la sangre perdida por adherencia al vidrio y el proceso se realiza con más precisión.
- b) Dado que con esta modificación se logra una gran uniformidad en la distribución de los hemoflagelados en la preparación, se contabilizaron 20 campos en lugar de 50 como en la

técnica original.

- c) Se utilizó un objetivo de 10 X en lugar de 12.5 X lo cual -
aumenta el número de parásito contados por campo.

La técnica modificada de Pizzi se utilizó por su rapidez y el menor gasto de sangre para el conteo de tripomastigotes. Nuestros ensayos mostraron que la metodología era bastante precisa.

Se eligieron los días de altas parasitemias para facilitar la observación de la disminución de la densidad de flagelados - en sangre. Además los ciclos extra e intracelular no están sin cronizados, por lo que no se puede determinar el tiempo en que permanecen en la sangre las fases sanguíneas, en forma particular y por lo tanto la duración del contacto del hemoflagelado con el medicamento. Tal incertidumbre puede ser menos importan te para el resultado de este experimento, si se tiene población alta en sangre, con lo que se asegura la presencia de tripomas-
tigotes con distintos tiempos de permanencia en sangre. Además, analizando las gráficas de parasitemia se observa que a los - - días seleccionados, esta persiste en su pico máximo alrededor - de 24 horas y después paulatinamente disminuye en el tiempo, - hasta su desaparición.

El Padanil y el Lampit son compuestos con baja solubilidad en agua, por lo que las pruebas in vitro de su actividad tripanomicida se dificultan debido a la necesidad de utilizar com- - puestos que faciliten su solubilización, además de usarse a ba-

jas concentraciones. La administración 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 medicamentos contra el parásito.
- b) Se asemejan las condiciones de tratamiento en el hombre.
- c) Se eliminan los problemas de solubilidad de los compuestos, dado que la albúmina los transporta en la sangre.
- d) En este caso particular, resulta más económico el ensayo in vivo que las metodologías reportadas in vitro.

La aplicación de los medicamentos es una etapa delicada en el experimento. Se debe evitar en lo posible el estrés de los animales, por exceso en su manipulación y el daño mecánico por la introducción de la aguja. Los ratones en los que no se tienen las precauciones mencionadas, presentan una conducta diferente a lo normal, se les ve poco activos, no se alimentan ni - beben agua.

Cuando se sometió la cepa MIGUZ a los medicamentos a dosis iguales que las utilizadas por Brener (1984) no se presentó modificación alguna de la parasitemia en las 6 horas transcurridas después del tratamiento, ni aún dos horas más tarde (8 ho--

ras). El mismo caso se dió en las pruebas para las cepas NINOA y CID. Por lo anterior se decidió utilizar dosis mayores (750 y 1000 mg/kg). A pesar de esto la parasitemia se mantuvo sin disminuir en forma detectable. Esto nos hace suponer que las cepas CID, NINOA y MIGUZ son resistentes a la acción tripanomicida del Lampit y Radanil a las dosis probadas.

Al probar otra cepa (la ZAACHILA) los resultados fueron alentadores al obtener una disminución importante de la parasitemia. A dosis de 500 mg/kg de ambos medicamentos y a partir de la cuarta hora post-tratamiento se observó una baja en la densidad de flagelados en sangre de aproximadamente 70%. La disminución de la parasitemia fue gradual conforme avanzaba el tiempo y se aumentaba la concentración de los fármacos. De tal manera, que a dosis de 1000 mg/kg y a un tiempo de 8 horas la parasitemia apenas se hacía observable (Gráfica 1).

La cepa ZAACHILA fue sensible a la acción parasiticida de los quimioterapéuticos empleados y por lo tanto validaba la metodología utilizada ya que si no se había logrado disminuir la parasitemia de las cepas CID, NINOA y MIGUZ ésto era debido probablemente a que estas resultaron resistentes a los fármacos y no a errores metodológicos.

El término "cepa" aplicado a T. cruzi es empleado muy frecuentemente entre los investigadores que trabajan con este interesante protozooario. "Cepa" define a una población del parási-

to aislada en un momento dado a partir de un hospedero determinado y mantenido a partir de su aislamiento por pases en el laboratorio (Deane, 1984). Las cepas por lo tanto pueden estar constituidas por diversas poblaciones heterogéneas de T. cruzi.

Esto nos motivó a probar una clona obtenida a partir de cada cepa resistente a los fármacos.

La clona CID-1 resultó aún más sensible que la cepa ZAACHILA, teniendo una reducción de alrededor del 30% con dosis de 250 mg/kg. Únicamente presentó sensibilidad hacia el Lampit, ya que el Radanil no produjo reducción en la parasitemia en las dosis probadas. La disminución en la parasitemia se manifestó hasta las 4 horas y aumentó en forma gradual hasta las 8 horas. La dosis-respuesta fue también gradual obteniendo casi la eliminación de los parásitos en sangre a dosis de 1000 mg/kg (Gráfica 2).

La clona MIGUZ-1, al igual que la cepa original, fue resistente a ambos medicamentos. La clona NINOA-1 presentó reducción de alrededor del 50% a dosis de 750 y 1000 mg/kg para ambos productos químicos (Gráfica 3).

Las diferencias en el comportamiento frente a los fármacos empleados es un ejemplo más que muestra la heterogeneidad de las poblaciones de T. cruzi que se encuentran en la naturaleza.

Dos de cuatro clonas fueron sensibles a la acción de los tripanomicidas. Además algunas clonas se comportaron diferente a las cepas, como en los casos de las clonas CID-1 y NINOA-1, mientras que la clona MIGUZ-1 no varía con relación a la cepa original.

En la introducción teórica se menciona el mecanismo de acción tripanomicida de los productos evaluados. También comentamos que los medicamentos no han mostrado una eficiencia en la cura de la Enfermedad de Chagas en todos los casos probados. El mismo Brener (1984) reportó cepas sensibles, así como resistentes a ambos fármacos.

De los resultados obtenidos se observa que las clonas y cepas que resultaron sensibles requieren dosis mayores que las utilizadas por Brener (1984) para lograr reducciones comparables.

Hay que mencionar que si el tiempo de permanencia de los tripomastigotes en la sangre es muy corto por penetrar a las células en un breve lapso, la acción tripanomicida de los fármacos tal vez no alcance a afectar en forma importante a los hemoflagelados. Este es un hecho experimental que reportó Brener (1969), citando cepas de T. cruzi que penetran muy rápido a los tejidos del hospedero y otras que persisten algunas horas en sangre circulante. En dichas cepas el efecto del medicamento podría enmascarse. En las cepas utilizadas en el presente

F. Conclusiones

El método utilizado por Brener en 1984 se adecuó a las condiciones de laboratorio para evaluar la susceptibilidad de cepas mexicanas de T. cruzi in vivo a dos fármacos, Radanil y Lampit, únicos utilizados en México para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

De acuerdo a la experiencia adquirida podemos hacer los siguientes comentarios:

- a) La técnica es muy precisa y nos da una idea muy cercana a la realidad.
- b) El bajo costo, rapidez y sencillez, son características muy convenientes de ésta técnica.
- c) Se pueden probar otros medicamentos tripanomicidas.

Para la precisión de la técnica basados en nuestra experiencia, proponemos utilizar una amplia gama de dosis y cepas, así como de clones de estas mismas. Lo que es aún más importante es contar con una alta densidad de flagelados en sangre; observar el comprometimiento de los flagelados de cada cepa mediante las curvas de parasitemia además de utilizar la técnica de Pizzi (modificada) para realizar la cuenta de parásitos en sangre que está propuesta en este trabajo.

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir - que de las cuatro cepas utilizadas en el experimento, solo una resultó sensible a la acción tripanomicida de los medicamentos evaluados. Las clonas obtenidas de las cepas experimentales se comportaron de manera diferente a excepción de la clona MIGUZ-1.

De estos resultados podemos decir que dentro de las cepas mexicanas de T. cruzi existen cepas sensibles y resistentes a los fármacos Radanil y Lampit. Debido al diferente comportamiento entre clonas y cepas podemos hablar de la heterogeneidad de las diferentes cepas.

Debido a que se necesitaron dosis mayores que las reportadas para las cepas brasileñas para observar disminuciones semejantes en la parasitemia, podemos hablar de una mayor resistencia de las cepas mexicanas a estos fármacos.

Es necesario aumentar el número de cepas en estas pruebas para obtener conclusiones más contundentes acerca de la sensibilidad de las cepas mexicanas en comparación con las brasileñas.

BIBLIOGRAFIA

1. Alarcón Segovia, S.C. et al. (1976), Inmunología de la enfermedad de Chagas, Boletín de la Oficina Sanitaria Paname-
ricana. Marzo.
2. Avila J. (1983), Chagas' disease. Sixth programe report.
TDR/PR-6/UNADP/World Bank/WHO.
3. Boainain, E. (1979), Tratamiento Etiológico de Doenga de -
Chagas na fase cronica. Rev. Goiana Med. 25:1-60.
4. Brener, Z. (1962), Therapeutic activity and criterion of -
cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cru-
zi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 4: 389-396
5. Brener, Z. (1969), The behaviour of slender and stout - -
forms of Trypanosoma cruzi in the blood stream of normal
and immune mice. Annals of tropical Medicine and Parasitology.
Vol. 63, No. 2.
6. Brener, Z. (1971), Study of the action of some active - -
drugs against Trypanosoma cruzi blood forms. Rev. Inst.
Med. Trop. Sao Paulo, 13: 302-306.
7. Brener, Z.; Costa. C.A.G. & Chiari, C.A. (1976), Diferen-
ces in the susceptibility of Trypanosoma cruzi strain to

- active chemotherapeutic agents. Rev. Inst. Med. Trop. -
Sao Paulo 18 (6): 450-455.
8. Brener, Z.; Leny, S.; Filardi. (1984), A rapid method for testing in vivo the susceptibility of diferents strains of Trypanosoma cruzi to active chemotherapeutic agents. Mem. Ins. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Vol. 79 (2): - - 221-225.
9. Deane, M.D.; Jansen, A.M.; Mangia, R.H.A. & Morel, C.M. - (1984), Areour laboratory "strains" representative samples of T. cruzi populations that circulate in nature. - Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Suppl. Vol. 79: 19-24.
10. De Souza, W. (1984), Cell Biology of Trypanosoma cruzi. International Review or Citology Vol. 86 pag. 197-283.
11. Gutteridge, W. E. (1981), Trypanosoma cruzi: recent biochemical advances. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Vol. 75 No. 4.
12. Hoare, C.A. and Wallace, F. G. (1966), Developmental stages of Trypanosomatid flagellates and new terminology. Nature (London) 212: 1385-1386.
13. Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox F.E.G., Deroux, G., - Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A.

- R., Lom, J. Lynn, D., Reinhold, H. G., Page, E. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. y Wallace, F. F. (1980), A newly revised Classification of the protozoa. J. Protozool 27 (1): 37-58.
14. Moncayo, A. (1966), Actividades de Pesquisa do Scientific Working Group (SWG) on Chagas' Disease 1922/1985. Mem - - Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Suppl. Vol. 81, November, pag. 184.
15. Pizzi, T. (1957), Inmunología de la Enfermedad de Chagas, Santiago, Universidad de Chile.
16. Sánchez, s. (1987), El xenodiagnóstico en la Enfermedad de Chagas. Tesis profesional, Químico, Bacteriólogo y Parasitólogo ENCB-IPN, México.
17. Schmidt, G. (1981), Foundation of parasitology. 2a. edición. USA. Moncayo Company, pag. 68-70.
18. Stoppani, A. (1983), Bioquímica del Trypanosoma cruzi. Inter-ciencia. Nov.-Dic. Vol. 8 No. 6.
19. Tay, J. (1980), La Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Rev. Sal. Publ. (Mex.) 1966; 34 pag. 107-113.
20. Turrens, F. (1926), Inhibitory action of the antitumor - -

Effect of lonidamine on mitochondrial respiration of Trypanosoma cruzi and T. brucei. Molecular and biochemica Parasitology, 20.

21. Velasco, C., (1986), Importancia de la Enfermedad de Chagas en México. Rev. lat-amer. Microbiol, 28: 275-283.
22. W.H.O. (1981), World Health Organization. UNDP/World Bank/ - WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease TDR/CHEMCHA/DC WKSHP/ 61.3 Washington, D.C. 23-27 November 1981.
23. W.H.O. (1986), 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 - Relatorio dos - "Steering Committees" (SC) ao "Scientific and Technical - Review Committee" (STRC)- Copilado por A. Moncayo.