



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE LA
ACTIVIDAD DEL ETANIDAZOL
(N-(2-hidroxietil)-2-nitro-1-imidazolacetamida)
CONTRA CEPAS MEXICANAS DE
Trypanosoma Cruzi

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
ANDREA ALEJANDRA RUIZ ÁVILA



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

A G R A D E C I M I E N T O S



A mi directora de tesis, Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez, a quien siempre agradeceré su valiosa asesoría, apoyo incondicional y confianza para el desarrollo de este trabajo

Al Técnico Académico M. en C. Ignacio Martínez Martínez por su asesoría y consejos sobre el manejo de los parásitos

A la Biol. Andrea Jiménez Marín y a la QFB. María Luisa Martínez Velasco por su colaboración en la enseñanza de las técnicas necesarias para el desarrollo de este trabajo.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Estudios sobre la Tripanosomiasis Americana del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El proyecto fue apoyado por los donativos del CONACYT No. 47 822Q y de DGAPA de la UNAM No. IN212806



DEDICATORIAS



*A mis padres Pablo y Marcela
Gracias por su amor, confianza,
comprensión y por darme la fortaleza
necesaria para que alcance mis metas.
Siempre los llevo en mi corazón*

*A mis abuelos
A quienes con todo amor y respeto
agradezco sus consejos que han sido
valiosos para mi*

*A mis tíos y primos
Por su apoyo, entusiasmo y
motivación, por creer en mi*

*A mis amigos, profesores, a
todas las personas que me han
brindado su amistad y que
han sido una parte importante
en mi vida*

*A la Universidad Nacional
Autónoma de México
Le agradezco mi formación
profesional y personal*

Gracias por Todo





“Si no conozco una cosa, la investigaré”

Louis Pasteur

1822-1895

Químico y microbiólogo francés



ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II	INTRODUCCIÓN	
II.1	Epidemiología de la Enfermedad de Chagas	3
II.2	El parásito	4
II.3	Ciclo de vida	6
II.4	Características Clínicas de la Enfermedad de Chagas	8
II.5	Características genéticas de <i>T. cruzi</i>	10
II.5.1	Características genéticas y biológicas en cepas mexicanas	11
II.6	Quimioterapéutica en la Enfermedad de Chagas	12
II.6.1	Nifurtimox y Benznidazol	12
II.6.1.1	Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol	14
II.6.2	Etanidazol	16
II.6.2.1	Mecanismo de acción del Etanidazol	18
II.6.2.2	El Etanidazol en la Enfermedad de Chagas	18
II.6.3	Avances en la Terapéutica	19
II.7	Diferencias de susceptibilidad a fármacos	20
III.	JUSTIFICACIÓN	22
IV.	HIPÓTESIS	23
V.	OBJETIVOS	
V.1	Objetivos generales	23
V.2	Objetivos particulares	23
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	
VI.1	Material Biológico	24
VI.2	Fármacos	24
VI.3	Evaluación del efecto de fármacos sobre tripomastigotes sanguíneos	
VI.3.1	Obtención de tripomastigotes sanguíneos	25
VI.3.2	Determinación del efecto de fármacos sobre el número y movilidad de tripomastigotes sanguíneos	26
VI.3.3	Determinación del efecto de fármacos sobre la morfología de tripomastigotes sanguíneos	26
VI.4	Evaluación del efecto de fármacos sobre amastigotes intracelulares	
VI.4.1	Procedimiento de infección "in vitro"	27
VI.4.2	Tratamiento con Benznidazol, Nifurtimox y Etanidazol	28
VI.4.3	Determinación del número de células infectadas y el número de amastigotes intracelulares	28
VI.5	Estadística	29
VII.	RESULTADOS	
VII.1	Efecto de fármacos sobre tripomastigotes sanguíneos de la cepa Querétaro	31
VII.1.1	Efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre el número de parásitos	31
VII.1.2	Efecto del Etanidazol sobre el número de parásitos	33
VII.1.3	Efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre la movilidad	34
VII.1.4	Efecto del Etanidazol sobre la movilidad	36
VII.1.5	Efecto de fármacos sobre la morfología de tripomastigotes	37
VII.2	Efecto de fármacos sobre tripomastigotes sanguíneos de la cepa Ninoa	40
VII.2.1	Efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre el número de parásitos	40
VII.2.2	Efecto del Etanidazol sobre el número de parásitos	41
VII.2.3	Efecto de fármacos sobre la movilidad y morfología de tripomastigotes	42
VII.3	Determinación de DL ₅₀ para tripomastigotes de las cepas Ninoa y Querétaro	42
VII.4	Comparación del efecto de fármacos sobre el número de tripomastigotes sanguíneos de las cepas Ninoa y Querétaro	43
VII.5	Efecto de fármacos sobre amastigotes intracelulares de la cepa Querétaro	46
VII.5.1	Efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre el número de células infectadas	46
VII.5.2	Efecto del Etanidazol sobre el número de células infectadas	47
VII.5.3	Efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre la actividad Anti-amastigote	47

VII.5.4	Efecto del Etanidazol sobre la actividad Anti-amastigote	50
VII.6	Efecto de fármacos sobre amastigotes intracelulares de la cepa Ninoa	51
VII.6.1	Efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre el número de células infectadas	51
VII.6.2	Efecto del Etanidazol sobre el número de células infectadas	52
VII.6.3	Efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre la actividad Anti-amastigote	53
VII.6.4	Efecto del Etanidazol sobre la actividad Anti-amastigote	56
VII.7	Determinación de CI_{50} para amastigotes intracelulares de las cepas Ninoa y Querétaro	57
VII.8	Comparación del efecto de fármacos sobre amastigotes intracelulares de las cepas Ninoa y Querétaro	58
VIII.	DISCUSIÓN	60
IX.	CONCLUSIONES	67
X.	RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS	68
XI.	BIBLIOGRAFÍA	69

ANEXOS

A.	Técnica para dividir cultivos de Células Vero	A
A.1.	Preparación de solución de EDTA	A
A.1.1	Preparación de PBS 1X	B
A.2.	Preparación de solución de Tripsina (1 mg/mL)	B
B.	Preparación de Medio D – MEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) y complementación	C
B.1.	Preparación de L – Glutamina	D
B.2.	Preparación de Antibióticos	D
C.	Utilización de la cámara de Neubauer	E
D.	Preparación de colorante Giemsa	F
E.	Tratamiento de las laminillas de teflón (Cell – line 10 – 476) anterior al ensayo de infección	G
F.	Método Probit	H

ÍNDICE DE FIGURAS

1.	<i>Triatoma phyllosoma</i>	3
2.	Países endémicos de la Enfermedad de Chagas	4
3.	Morfología de los distintos estadios de <i>T. cruzi</i> (tripomastigote, epimastigote, amastigote)	6
4.	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
5.	Signos patognomónicos de la Enfermedad de Chagas	8
6.	Manifestaciones clínicas de la etapa crónica de la Enfermedad de Chagas	10
7.	Estructuras de los compuestos utilizados para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas	13
8.	Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol	15
9.	Estructura del Etanidazol	16
10.	Efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre el número de tripomastigotes sanguíneos expresados en porcentaje con respecto al control de la cepa Querétaro	32
11.	Efecto del Etanidazol sobre número de tripomastigotes sanguíneos expresados en porcentaje con respecto al control de la cepa Querétaro	33
12.	Efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre la movilidad de tripomastigotes sanguíneos expresados en porcentaje con respecto al control de la cepa Querétaro	35
13.	Efecto del Etanidazol sobre la movilidad de tripomastigotes sanguíneos expresados en porcentaje con respecto al control de la cepa Querétaro	36
14.	Alteraciones morfológicas de tripomastigotes sanguíneos de la cepa Querétaro	38
15.	Efecto de Benznidazol, Nifurtimox y Etanidazol sobre la morfología de tripomastigotes sanguíneos de la cepa Querétaro	39

16.	Efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre el número de tripomastigotes sanguíneos expresados en porcentaje con respecto al control de la cepa Ninoa	41
17.	Efecto del Etanidazol sobre el número de tripomastigotes sanguíneos expresados en porcentaje con respecto al control de la cepa Ninoa	42
18.	Comparación de la relación dosis – respuesta reflejada en la disminución del número de tripomastigotes sanguíneos entre las cepas Querétaro y Ninoa	45
19.	Efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre el número de células infectadas con amastigotes de la cepa Querétaro	46
20.	Efecto del Etanidazol sobre el número de células infectadas con amastigotes de la cepa Querétaro	47
21.	Efecto del Nifurtimox sobre el número de amastigotes intracelulares de la cepa Querétaro	48
22.	Efecto del Benznidazol sobre el número amastigotes intracelulares de la cepa Querétaro	49
23.	Efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre el porcentaje de actividad Anti-amastigote de la cepa Querétaro	49
24.	Efecto del Etanidazol sobre el número amastigotes intracelulares de la cepa Querétaro	50
25.	Efecto del Etanidazol sobre el porcentaje de actividad Anti-amastigote de la cepa Querétaro	51
26.	Efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre el número de células infectadas con amastigotes de la cepa Ninoa	52
27.	Efecto del Etanidazol sobre el número de células infectadas con amastigotes de la cepa Ninoa	53
28.	Efecto del Nifurtimox sobre el número de amastigotes intracelulares de la cepa Ninoa	54
29.	Efecto de Benznidazol sobre el número de amastigotes intracelulares de la cepa Ninoa	55
30.	Efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre el porcentaje de actividad Anti-amastigote de la cepa Ninoa	55
31.	Efecto del Etanidazol sobre el número de amastigotes intracelulares de la cepa Ninoa	56
32.	Efecto del Etanidazol sobre el porcentaje de actividad Anti-amastigote de la cepa Ninoa	57
33.	Comparación de la relación dosis – respuesta reflejada en el aumento de la actividad Anti-amastigote entre las cepas Querétaro y Ninoa	59

ÍNDICE DE TABLAS

1.	Valores de DL_{50} de Benznidazol y Nifurtimox para inhibir el crecimiento de tripomastigotes sanguíneos	43
2.	Valores de CI_{50} para Benznidazol y Nifurtimox para inhibir el crecimiento de amastigotes intracelulares	58



I. RESUMEN

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, es un importante problema de salud pública en América Latina. El tratamiento de esta enfermedad está basado en la utilización de dos compuestos nitroderivados: el Nifurtimox y el Benznidazol, los cuales se ha reportado que son efectivos únicamente en la etapa aguda de la enfermedad, además de que llegan a producir efectos adversos severos por lo cual los tratamientos deben ser suspendidos. En varios trabajos también se ha demostrado que existe una gran variabilidad en la susceptibilidad a fármacos entre las cepas de *T. cruzi*, lo que junto con la poca eficiencia terapéutica, hace necesaria la búsqueda de nuevos fármacos para tratar la enfermedad. En un estudio previo (Petray et al., 2004), se determinó que el Etanidazol (nitroimidazol utilizado comúnmente para el tratamiento del cáncer), presentó actividad sobre tripomastigotes y amastigotes de la cepa sudamericana RA de *T. cruzi*.

En el presente trabajo se evaluó el efecto del Etanidazol sobre la viabilidad y la movilidad de tripomastigotes de las cepas mexicanas Querétaro y Ninoa y sobre la capacidad infectiva de amastigotes de las mismas cepas en macrófagos J 774 "in vitro" y el porcentaje de actividad Anti-amastigote (%AA). Se encontró que el Etanidazol presenta un ligero efecto (en comparación con los efectos observados con el Nifurtimox y Benznidazol) sobre tripomastigotes de ambas cepas, observándose un 20% de disminución en el porcentaje de parásitos vivos de la cepa Querétaro y un 40% de disminución en el porcentaje de parásitos vivos de la cepa Ninoa a la concentración 1200 μM y un 20% de disminución en la de movilidad de la cepa Querétaro en la concentración 1200 μM .; además no se observó actividad sobre amastigotes contenidos en macrófagos. Sin embargo, se encontró una respuesta diferencial entre las cepas Ninoa y Querétaro respecto a los tratamientos con Nifurtimox y Benznidazol, siendo la cepa Ninoa ($DL_{50} \text{ Benznidazol} = 6.59 \mu\text{M}$, $DL_{50} \text{ Nifurtimox} =$



4.63 μM , IC_{50} Beznidazol = 0.60 μM , IC_{50} Nifurtimox = 0.27 μM) más sensible a éstos en comparación con la cepa Querétaro (DL_{50} Benznidazol = 19.8 μM , DL_{50} Nifurtimox = 12.98 μM , IC_{50} Beznidazol = 1.82 μM , IC_{50} Nifurtimox = 2.00 μM). En conclusión este estudio mostró que las cepas mexicanas Ninoa y Querétaro son resistentes al efecto del Etanidazol



II. INTRODUCCIÓN

II.1 Epidemiología de la Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas es llamada así en honor a su descubridor el Doctor Carlos Chagas (1909), quien además de describir el ciclo de vida del parásito, identificó los insectos que transmiten la enfermedad, así como a los reservorios animales y sugirió medidas para prevenirla. Esta enfermedad es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, y es transmitida a los mamíferos por medio de los vectores Redúvidos hematófagos pertenecientes a la familia *Triatominae*, que está conformada por varias especies, entre las que se mencionan: *Triatoma infestans*, *T. barberi*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. longipennis*, *T. maculata*, *T. phyllosoma* y *T. sordida*, (Figura 1) (WHO, 2002).



Figura 1. *Triatoma phyllosoma*. Esta especie es considerada un importante transmisor de la Enfermedad de Chagas en México (tomado de <http://www.facmed.unam.mx/.../chagas/img/cuatro.jpg>).

Esta enfermedad es un importante problema de Salud Pública en América Latina, los reportes estadísticos del año 2002 indican que de 16 – 18 millones de personas se encuentran infectadas, 50,000 mueren cada año y aproximadamente 120 millones (25% de la población en Latinoamérica) se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (Strategic direction for research <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>). Se considera endémica desde México hasta Sudamérica (Figura 2) y en el caso particular de México, los reportes estadísticos del 2002 indican que las personas



infectadas se encuentran principalmente en los estados de Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sonora, Yucatán y Zacatecas, siendo la prevalencia de la enfermedad mayor en la costa del Pacífico (WHO, 2002).



Figura 2. Países Endémicos de la Enfermedad de Chagas. Esta Enfermedad es endémica desde México hasta Sudamérica, observándose la distribución de ésta en los países con coloración más oscura (tomado de <http://www.who.int/ctd/chagas/chagmap1.jpg>).

II.2 El parásito

T. cruzi infecta a células de mamíferos y es altamente pleomórfico, por lo cual podemos encontrar distintos estadios en su ciclo de vida. Cada estadio presenta propiedades únicas y las transformaciones que ocurren entre éstos se desarrollan en respuesta a variaciones en las condiciones de su entorno. La identificación de estos estadios está basada en características morfológicas, tales como la forma general de la célula, la posición entre el cinetoplasto y el núcleo, así como la región donde el flagelo emerge del saco flagelar. De acuerdo a esto, encontramos tres estadios claramente identificados: tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes (Figura 3).



El estadio replicativo intracelular es conocido como amastigote, que es una forma redonda que posee un flagelo corto y se divide por fisión binaria en un tiempo de 7 – 14 horas, aunque es importante mencionar que este tiempo de división depende de factores tales como la cepa de la que se trate, la temperatura de incubación y características del medio de cultivo en el que se desarrolla el parásito. Esta forma parasitaria es redonda y mide de 2 – 2.5 μm , no presenta flagelo libre, pero éste se va a encontrar dentro de una bolsa denominada saco flagelar, también se puede observar en él un gran núcleo y el cinetoplasto (formado principalmente por DNA y mitocondrias) (Tay et al., 1998).

El estadio conocido como tripomastigote va a ser encontrado en el mamífero hospedero de manera intracelular en los tejidos y extracelular en circulación. En el vector hematófago se encuentra sólo de manera extracelular, localizado en el intestino posterior llevando el nombre de tripomastigote metacíclico. Estas formas parasitarias no replicativas son flagelados de cuerpo alargado, que miden aproximadamente de 20 – 25 μm y presentan el cinetoplasto en posición subterminal posterior al núcleo. Del cinetoplasto surge la membrana ondulante que recorre al parásito a todo lo largo de su cuerpo y sale libre en la porción anterior (Tay et al., 1998).

Los epimastigotes son las formas replicativas extracelulares, y van a localizarse en el intestino medio de los insectos en donde se multiplican. Estas formas parasitarias son de aspecto fusiforme de aproximadamente 20 – 25 μm de longitud, su cinetoplasto se encuentra en posición anterior y cercano al núcleo, y el flagelo forma una pequeña membrana ondulante (Tay et al., 1998).

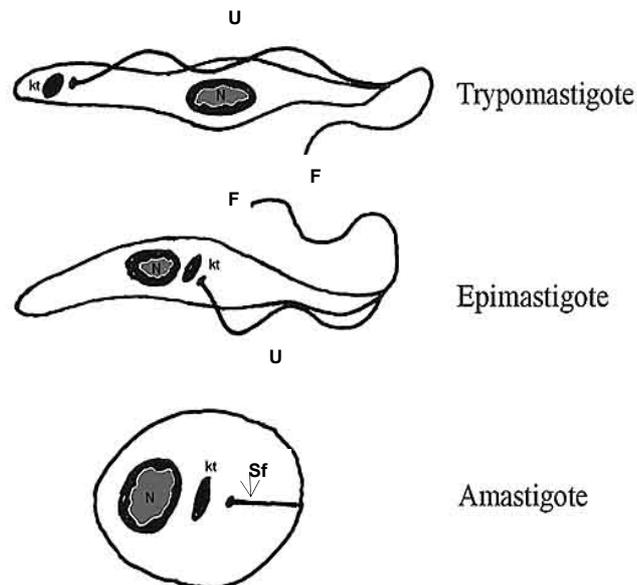


Figura 3. Morfología de los distintos estadios de *T. cruzi* (tripomastigote, epimastigote, amastigote). Um: membrana ondulante, kt: cinetoplasto, N: núcleo, F: flagelo, Sf: saco flagelar (tomado de <http://www.bioscience.org/2003/v8/e/948/fig2.jpg>).

II.3 Ciclo de vida

Cuando un Redúvido infectado con *T. cruzi* se alimenta de la sangre del mamífero hospedero, puede liberar tripomastigotes metacíclicos, que es la fase infectiva del parásito, en las heces u orina. Éstos se introducen a través de abrasiones en la piel o por contacto con membranas mucosas. Una vez en el hospedero, los tripomastigotes pueden infectar células vecinas. Dentro de la célula, los tripomastigotes se diferencian en amastigotes, los que se dividen por fisión binaria, y posteriormente vuelven a diferenciarse a tripomastigotes. Estos tripomastigotes recién diferenciados son liberados de la célula para iniciar un nuevo ciclo infectivo en las células vecinas, o bien pueden mantenerse en circulación. La presencia de los parásitos en circulación les va a permitir propagar la infección al dirigirse hacia otros tejidos (células de músculo cardiaco, esquelético, células del sistema reticuloendotelial y células ganglionares entre otras).



Los tripomastigotes que se encuentran en circulación pueden entrar también al vector hematófago vía la ingesta de sangre del mamífero. Éstos van a transformarse en epimastigotes que van a migrar al intestino medio en donde se van a multiplicar. Después de multiplicarse, pasan al intestino posterior en donde se unen a las glándulas rectales. Una vez unidos a las glándulas rectales se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, que serán liberados y eliminados a través de las heces fecales durante la ingesta de sangre, y de esta manera se reinicia el ciclo (Takle y Snary, 1993) (Figura 4).

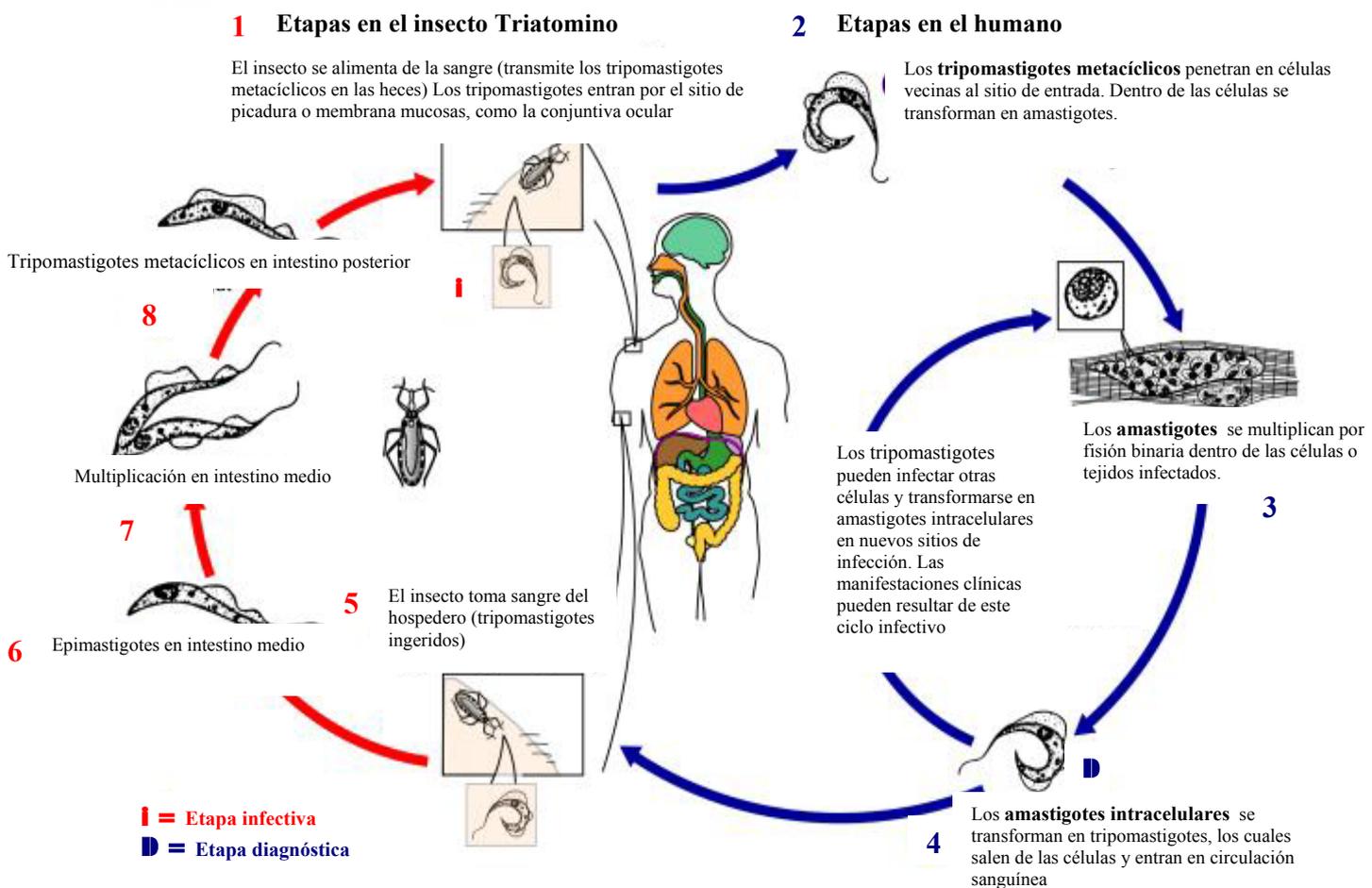


Figura 4. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. En la figura se explican cada uno de los estadios del ciclo de vida del parásito (tomado de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/b/b8/Chagas_disease_cycle.jpeg).



II.4 Características Clínicas de la Enfermedad de Chagas

Recién infectado el mamífero se produce la fase aguda de la infección, la que está caracterizada por una alta parasitemia en sangre y una extensa parasitosis de tejidos locales. Por lo general, esta fase es asintomática, pero algunas veces pueden presentarse síntomas tales como fiebre, vómito, diarrea, anorexia, inflamación de tejido linfático, miocarditis y en algunos casos de pacientes infantiles se puede desarrollar meningoencefalitis; estos síntomas desaparecen espontáneamente después de 4 a 8 semanas sin alguna secuela aparente (WHO, 2002). Los síntomas anteriormente descritos no son característicos de la enfermedad, sino que pueden ser confundidos con otros padecimientos; sin embargo, en algunas ocasiones se pueden observar signos patognomónicos en el lugar de entrada del parásito. Cuando la vía de entrada es en la piel, se observa una lesión que se conoce como Chagoma (Figura 5) y cuando se da a través de las membranas mucosas oculares, se desarrolla una conjuntivitis unilateral conocida como Síndrome de Romaña (Figura 5) (Takle y Snary, 1993). La fase aguda de la enfermedad se reconoce sólo en aproximadamente del 1 – 2% de los individuos que adquieren la infección (WHO, 2002).

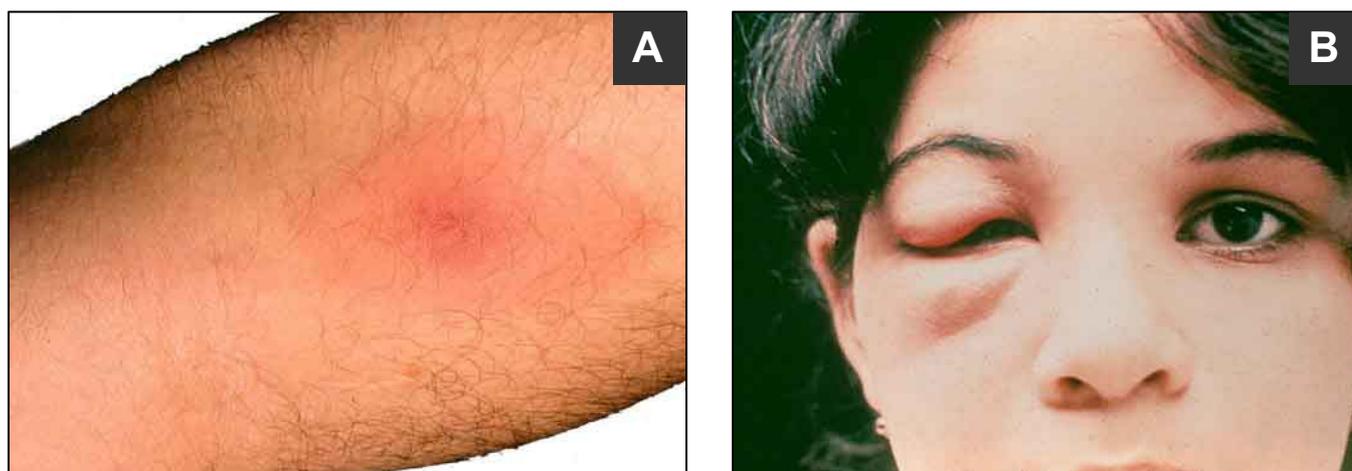


Figura 5. Signos patognomónicos de la Enfermedad de Chagas. Signos observados en la vía de entrada del parásito durante la fase aguda de la enfermedad, cuando la vía de entrada es a través de la piel (A) se conoce como Chagoma y cuando la vía de entrada es a través de las membranas mucosas (B) se conoce como Síndrome de Romaña (tomado de <http://www.bioscience.org/2003/v8/e/948/fig5.jpg> y <http://www.jyi.org/articleimages/185/originals/img3.jpg>).



La alta parasitemia en sangre sigue por cerca de uno o dos meses, después de este tiempo el paciente entra a una fase latente, indeterminada o crónica asintomática. Esta etapa está caracterizada por una baja parasitemia, ausencia de síntomas, un tiempo inespecífico de duración y detección de anticuerpos IgG anti – *T. cruzi*. Durante esta fase, puede ocurrir la proliferación del parásito dentro de las células, por lo que algunos autores la consideran como un periodo de aumento gradual de los síntomas característicos de la etapa crónica sintomática, posiblemente como resultado del lento desarrollo de un proceso de autoinmunidad (Takle y Snary, 1993). Cerca del 50 al 70% de los individuos infectados permanecen bajo esta condición por el resto de sus vidas (WHO, 2002).

Posteriormente, el paciente entra a la etapa crónica sintomática de la enfermedad, en la cual se ven afectados principalmente el corazón y el tracto digestivo del hospedero. En el caso de la afección cardiaca las manifestaciones clínicas son: falla cardiaca, agrandamiento del corazón, anormalidades electrocardiográficas, dilatación, aneurismas del ventrículo izquierdo, arritmias y tromboembolismo entre otras. El síndrome en conjunto es conocido como megacardio o cardiomiopatía chagásica (Figura 6) (WHO, 2002). La forma digestiva de la enfermedad involucra aperistaltismo y agrandamiento de las regiones del tracto digestivo, originando así las características conocidas como megaesófago y megacolon (Figura 6). Las formas cardiacas y digestivas parecen tener una causa común asociada con la destrucción del sistema nervioso autónomo en los órganos afectados, lo cual trae como consecuencia reducción en el tono y eficiencia muscular (Takle y Snary, 1993). Las células ganglionares también son destruidas tanto por la infección con los parásitos como por la acción de anticuerpos. Dadas las características anteriormente mencionadas, de un 60% - 70% de las personas que se encuentran en la fase crónica de la enfermedad mueren (WHO, 2002).

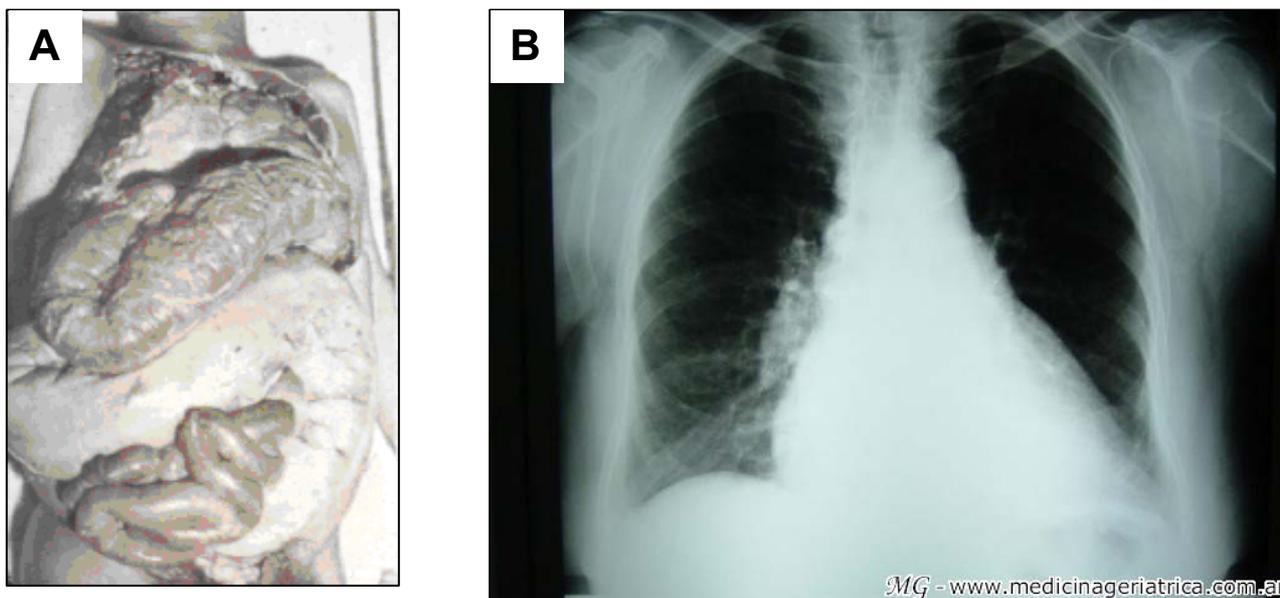


Figura 6. Manifestaciones clínicas de la etapa crónica de la Enfermedad de Chagas. La forma digestiva (A) es conocida como megacolon y la forma cardíaca (B) es conocida como megacardio, en ambas figuras puede observarse un agrandamiento de los órganos (tomado de <http://tmcr.usuhs.mil/tmcr/chapter4/large4/04-027D.jpg> y <http://www.med.sc.edu:85/lecture/images/mega1.gif>).

II.5 Características genéticas de *T. cruzi*

Gracias al desarrollo de la técnica de electroforesis de proteínas, se evidenció en los diferentes organismos una gran variabilidad genética, y en el caso de *T. cruzi* se observó una gran heterogeneidad isoenzimática. El análisis de este tipo de proteínas está basado en que las isoenzimas son enzimas con la misma función pero de movilidad electroforética diferente. La movilidad de éstas depende de la carga de la proteína, la cual va a estar ligada esencialmente a su estructura primaria. La estructura primaria evoluciona por mutaciones puntuales y la selección natural interviene muy poco en ellas. Este tipo de análisis permite medir distancias evolutivas entre los organismos y posteriormente construir filogenias. A partir de estos datos se analizó el modo de reproducción de *T. cruzi*, el cual se concluyó se da de manera asexual, generando de esta manera una estructura de poblaciones esencialmente clonal. La estructura clonal implica la existencia de entidades independientes (clones), que puede presentar propiedades biológicas diferentes, aunque no se excluyen los fenómenos de intercambios genéticos entre las cepas (Brenière et al., 1999).



Con base en estos estudios isoenzimáticos fue posible identificar tres grupos de cepas agrupadas en función de su perfil enzimático, los que fueron denominados zimodemas: Z1, Z2 y Z3. En un principio cada uno de estos zimodemas parecía ser muy homogéneo, pero gracias a estudios posteriores con 250 cepas brasileñas se encontró que existía una mayor variabilidad, aunque cada cepa se podía relacionar a uno de los zimodemas anteriormente descritos (Brenière et al. 1999). Se concluyó entonces que *T. cruzi* presenta un gran número de clones que a su vez pueden agruparse en zimodemas que se encuentran distribuidos sobre largas áreas geográficas. Posteriormente, por medio de análisis isoenzimáticos, análisis de RAPD (Amplificación al azar de DNA polimórfico basado en la utilización de iniciadores de secuencia corta que se emplean en una reacción de PCR con el DNA blanco), análisis de genes de mini exón (secuencia nuclear cuyos primeros 39 nucleótidos del extremo 5' participan en la estabilidad de los RNAs mensajeros en *T. cruzi*) y análisis del ARN ribosomal (PCR de una región específica del gen 24S alfa); se mostró que las poblaciones de *T. cruzi* se reparten en dos principales genotipos o grupos genéticos. De acuerdo a esto, las cepas previamente nombradas Z1 o linaje 2 pertenecen al grupo genético I, mientras que las cepas nombradas Z2 y Z3 o linaje 1 pertenecen al grupo genético II que a su vez se divide en 5 subgrupos (IIa-e), (Brenière et al. 1999; Martínez, 2006; WHO, 2002).

II.5.1 Características genéticas y biológicas en cepas mexicanas de *T. cruzi*

Con base en estudios de RAPD (Bosseno et al., 2001) se ha podido confirmar que la mayoría de las cepas mexicanas de *T. cruzi* (sin importar sus distintas características biológicas) pertenecen al genotipo I y algunas pocas como el caso de Ver 03 y Ver 06 pertenecen al genotipo II. Esto indica que el genotipo I puede ser considerado como el principal agente causal de la Enfermedad de Chagas en México,



lo cual contrasta con la situación en Sudamérica, en donde el genotipo II juega un papel muy importante en la infección en humanos.

Por otro lado, con base en una serie de estudios realizados (López-Olmos et al., 1997) se ha encontrado que existe una alta heterogeneidad en algunas características biológicas (velocidad de crecimiento, transformación de epimastigotes a tripomastigotes, infectividad) y perfiles isoenzimáticos entre cepas mexicanas de *T. cruzi*. Por lo tanto, es difícil establecer una correlación entre las características biológicas, los perfiles isoenzimáticos y el origen geográfico de la cepa, lo cual refleja que el comportamiento biológico está influenciado por factores distintos a aquellos que pueden ser detectados en los análisis isoenzimáticos.

Esta heterogeneidad en características biológicas puede observarse en cepas que pertenecen al mismo grupo genético; en cepas mexicanas esto puede verse reflejado entre las cepas Ninoa y Querétaro. Estas cepas muestran un comportamiento biológico diferente entre ellas, que se puede ver reflejado en la infectividad in vitro y virulencia in vivo. In vivo, al inocular la misma cantidad de tripomastigotes (1×10^5) por vía peritoneal a ratones BALB/c, una cepa mata al 100% de los ratones durante la fase aguda de infección (Querétaro), mientras que la otra cepa no mata a ninguno de los ratones infectados, llegando estos hasta la fase crónica de la infección (Ninoa) (Sosa, 2003; Rico, 2004). In vitro, la diferencia se observa en la infectividad de las cepas, siendo la cepa Querétaro alrededor de 50% más infectiva que la cepa Ninoa, además de entrar más rápidamente a la célula hospedera (Jiménez, 2005).

II.6 Quimioterapéutica en la Enfermedad de Chagas

II.6.1 Nifurtimox y Benznidazol

La quimioterapéutica actualmente utilizada para el tratamiento de la enfermedad está basada en la utilización de compuestos nitroderivados, un nitrofurano (Nifurtimox)



y un nitroimidazol (Benznidazol) (Urbina et al., 2003). El Nifurtimox es administrado en una dosis oral de 8 – 10 mg/Kg por día, y después de 3.5 horas se advierten los valores plasmáticos máximos (10 a 20 μ M). El Beznidazol es administrado también vía oral a una dosis de 5 mg/Kg por día, logrando los niveles plasmáticos máximos de 3 a 4 horas después (8.5 a 10.8 μ M) (Figura 7) (Goodman et al., 2003).

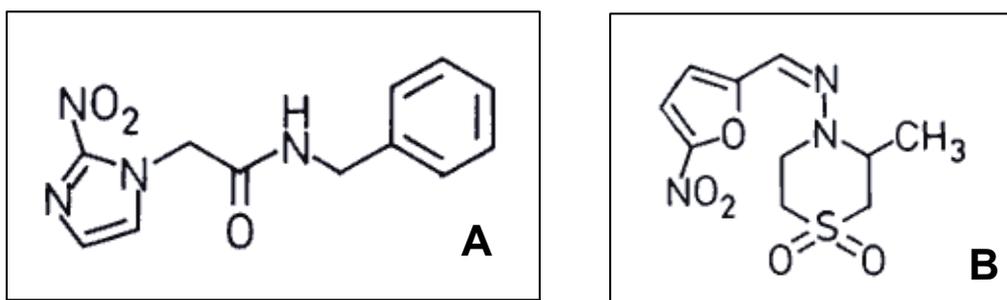


Figura 7. Estructuras de los compuestos utilizados para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. (A) Benznidazol y (B) Nifurtimox. En ambos compuestos la presencia del anillo nitroderivado en su estructura es determinante para su actividad biológica

Ambos compuestos presentan una actividad significativa en la fase aguda de la enfermedad, logrando más del 80% de la cura parasitológica en pacientes bajo tratamiento, la cura parasitológica se logra cuando el paciente presenta resultados negativos en las pruebas parasitológicas y serológicas (Cançado, 1999); sin embargo, son considerados poco eficaces para el tratamiento de la etapa crónica de la enfermedad. Lo anterior puede deberse a que ambos fármacos están encaminados hacia la eliminación del parásito, y aunque en algunos trabajos (García et al., 2004), se ha demostrado que el Benznidazol puede disminuir algunas alteraciones características de la fase crónica de la enfermedad, no se considera como completamente eficaz ya que otros fenómenos autoinmunes están implicados en el desarrollo de esta etapa de la enfermedad. (García et al., 2004; de Oliveira et al., 1997; Hernández et al., 2003).

Aunque se considera que algunos fenómenos autoinmunes se encuentran fuertemente asociados con la patología de la etapa crónica, la persistencia de los



parásitos en el hospedero origina un desbalance de la respuesta inmune que puede traer como consecuencia la autoinmunidad, por lo tanto, la eliminación de los parásitos es un prerrequisito para limitar la evolución de la enfermedad, y evitar o disminuir las consecuencias que pudieran presentarse a largo plazo (Croft, et al., 2005). Con base en lo anterior, se ha demostrado que en pacientes en etapa temprana crónica tratados con Benznidazol, si bien no alcanzan la cura parasitológica, muestran una reducción significativa en la ocurrencia de anomalías electrocardiográficas, así como disminución del deterioro característico en esta etapa de la enfermedad.

Por otro lado, es importante mencionar que ambos compuestos producen efectos adversos frecuentes (probablemente como consecuencia de daño oxidativo o reductivo en los tejidos del hospedero). Entre algunos efectos adversos podemos mencionar desde hipersensibilidad, como dermatitis, fiebre, ictericia, infiltrados pulmonares, anafilaxia, así como, náusea, vómito, mialgias y debilidad; pueden presentarse también complicaciones localizables en tubo digestivo y sistema nerviosos periférico y central. Se han señalado casos de leucopenia, de disminución en el número de espermatozoides y linfoma (Goodman et al., 2003). La aparición de estos efectos adversos es debida a que estos compuestos presentan un margen terapéutico muy estrecho (la dosis terapéutica es muy cercana a la dosis tóxica) (Petray, et. al 2004).

II.6.1.1 Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol

El Nifurtimox y el Benznidazol actúan vía la formación de radicales libres o de metabolitos electrofílicos. El grupo nitro presente en ambas moléculas es reducido a un grupo amino por la acción de nitrorreductasas con la formación de varios radicales libres y metabolitos electrofílicos. Este proceso inicia con la reacción catalizada por la enzima NADPH – citocromo P450 reductasa, que actúa en el grupo nitro de la



molécula ($R\text{-NO}_2$) produciendo el radical nitro anión intermediario ($R\text{-NO}_2^{\cdot-}$). Este radical entra a un ciclo redox con el oxígeno molecular, el cual se reduce parcialmente al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), mientras que el fármaco se regenera. El anión superóxido dismuta a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). A su vez, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en presencia de Fe^{3+} forma el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) el cual va a unirse a lípidos, proteínas y DNA provocando un daño sobre ellos, o bien se puede unir directamente al glutatión y el tripanotión libre (Figura 8), (Maya et al., 2003; Maya et al., 2006).

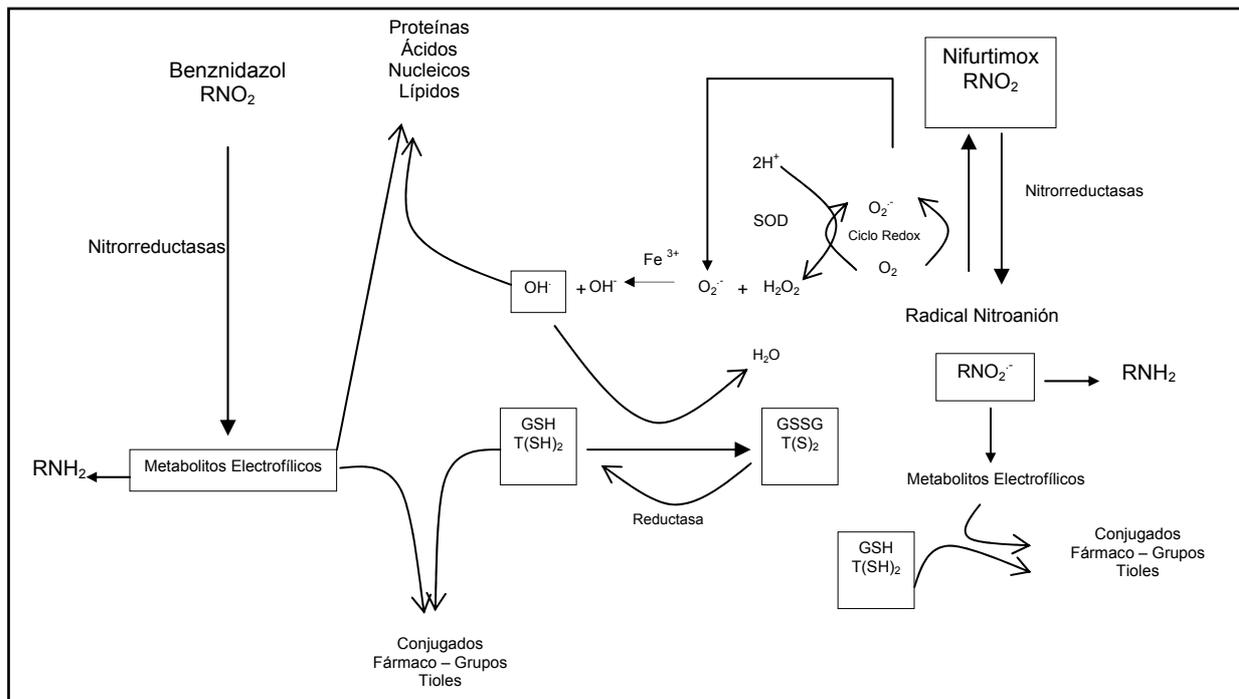


Figura 8. Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol. El grupo nitro de ambos compuestos es reducido a radicales libres o metabolitos electrofilicos por la acción de nitrorreductasas. Este radical nitroanión del nifurtimox puede unirse directamente al glutatión (GSH) y tripanotión ($T(SH)_2$) del parásito o bien puede entrar a un ciclo redox con el oxígeno presente y formar H_2O_2 por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). El peróxido de hidrógeno y el radical superóxido pueden a su vez formar el radical hidroxilo, el cual va a unirse a las macromoléculas del parásito (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, así como al glutatión (GSH) y tripanotión libre ($T(SH)_2$)). Los metabolitos electrofilicos formados a partir del Benznidazol también pueden afectar las macromoléculas anteriormente mencionadas (Maya et al., 2006).

En un estudio realizado por Docampo y Stoppani, 1979, se sugiere que la reducción intracelular del Nifurtimox genera un radical a partir del grupo nitro, que a su vez sigue el ciclo redox que trae como consecuencia la formación del anión superóxido



(O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esto indica que la generación de radicales libres de oxígeno es el principal mecanismo de acción del Nifurtimox, dado que estos radicales van a ser capaces de unirse a las macromoléculas del parásito provocando peroxidación de lípidos, destrucción de membranas, daño a DNA, unión a proteínas e inactivación de enzimas (Goijman y Stoppani, 1983). Dentro de las enzimas que se pueden ver inactivadas por la acción del Nifurtimox se encuentra la enzima tripanotión reductasa, la cual es importante en los procesos de detoxificación del parásito (Raether y Hanel, 2003). De la misma forma puede unirse a tioles libres como tripanotión y glutatión del parásito, limitando así sus mecanismos de detoxificación a radicales libres (Maya et al., 1997).

El mecanismo de acción del Benznidazol no depende de radicales libres de oxígeno como el caso del Nifurtimox (Maya et al., 2006). Al parecer los metabolitos reducidos del benznidazol se van a unir covalentemente con las moléculas sin pasar por un ciclo redox, afectando de esta manera a DNA y lípidos (Goijman y Stoppani, 1983). Además es capaz de disminuir los niveles de tripanotión, glutatión y de la enzima tripanotión reductasa.

II.6.2 Etanidazol

El Etanidazol es un nitroimidazol actualmente utilizado en el tratamiento del cáncer que pertenece al grupo de los radiosensibilizadores hipóxicos, (Figura 9).

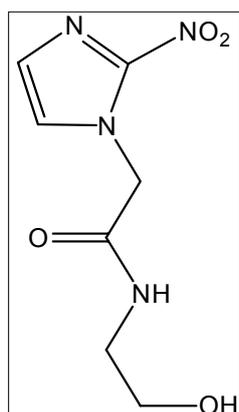


Figura 9. Estructura del Etanidazol. Se puede observar la presencia del anillo nitroderivado en la molécula, al cual se debe su actividad



Los radiosensibilizadores hipóxicos son agentes químicos o farmacológicos que incrementan el efecto letal de la radiación sobre células cancerosas, minimizando la acción sobre los tejidos normales. La pobre vascularización de las células tumorales trae como consecuencia la formación de células hipóxicas, las cuales son más resistentes a la radiación que las células oxigenadas; lo anterior se debe a que el oxígeno es necesario para la formación de los radicales libres de oxígeno (ROS) que van a dañar a las células tumorales (Rosenberg and Knox, 2006). Los sensibilizadores hipóxicos pueden imitar el efecto del oxígeno formando radicales libres que van a dañar al DNA de las células y aumentando de esta manera el efecto radiosensibilizador (Wang, et al., 2002). De acuerdo a lo anterior, estos agentes son utilizados para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer como el caso del cáncer de la cabeza y cuello, cervical, pulmón, cerebro, mama, ovario, próstata, entre otros.

La primera generación de radiosensibilizadores hipóxicos (misonidazol), de acuerdo a estudios en fase preclínica, resultaron ser una excelente estrategia terapéutica para la sensibilización de los tumores a la radiación sin provocar efectos concomitantes en los tejidos normales (Rosenberg and Knox, 2006). Sin embargo, en fases clínicas, el empleo de este fármaco trajo consigo la aparición de neuropatías (deterioro de nervios periféricos por lo que se rompe la habilidad de comunicación con músculos, órganos y tejidos), y como consecuencia dejó de ser considerado como un efectivo radiosensibilizador hipóxico (Rosenberg and Knox, 2006).

Posteriormente surge la segunda generación de radiosensibilizadores hipóxicos, entre los que se encuentra el Etanidazol. Este compuesto ha resultado ser menos tóxico que algunos otros radiosensibilizadores hipóxicos, incluyendo al misonidazol (Petray et al., 2004, Lawton et al., 1996), y se ha considerado a éste y algunos otros nitroimidazoles como radiosensibilizadores muy efectivos incluso cuando se utilizan a dosis muy altas, pues puede ser empleado a dosis tres veces mayores que las



empleadas para misonidazol (Coleman et al., 1987). Las dosis y el esquema terapéutico que se sigue al emplear el etanidazol dependen del tipo de cáncer del cual se trate; pero, generalmente se administra en dosis intravenosas de 2 g/m^2 cada tercer día. No debe de utilizarse por días consecutivos para evitar la incidencia de neuropatías (Urtasun et al., 1998; Eschwège et al., 1997) pues éstas comienzan a presentarse cuando se alcanza una dosis de 34 g/m^2 al llegar a las 6 semanas.

II.6.2.1 Mecanismo de acción del Etanidazol

Bajo condiciones aerobias, el etanidazol atraviesa por un ciclo redox que genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden resultar tóxicas para la célula a la cual se enfrente. Sin embargo, bajo condiciones hipóxicas, el etanidazol es reducido por una serie de nitrorreductasas sensibles al oxígeno para generar radicales libres que van a formar aductos con las macromoléculas de las células (Petray et al., 2004).

II.6.2.2 El Etanidazol en la Enfermedad de Chagas

En un estudio de evaluación (in vitro) de la actividad anti *T. cruzi* del Etanidazol, se demostró que éste presentaba un efecto sobre tripomastigotes y amastigotes contenidos en células Vero y J774 de la cepa sudamericana RA. Sin embargo, la dosis letal media ($DL_{50} = 174 \text{ } \mu\text{M}$ a las 24 h y $18 \text{ } \mu\text{M}$ a las 48 h para tripomastigotes) y la concentración inhibitoria 50 ($IC_{50} = 15 \text{ } \mu\text{M}$ para amastigotes) resultaron ser mayores para este compuesto que las que se observaron en el caso del Benznidazol ($DL_{50} = 6.6 \text{ } \mu\text{M}$ a las 24 h y $2.2 \text{ } \mu\text{M}$ a las 48 h para tripomastigotes y $IC_{50} = 1 \text{ } \mu\text{M}$ para amastigotes). Lo anterior nos indica que el Etanidazol resulta ser menos potente que el Benznidazol; sin embargo, esta característica no debe parecer un obstáculo para la utilización de este compuesto como una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas, ya que como se mencionó anteriormente este ha resultado



ser menos tóxico, lo cual permitiría aumentar las dosis del fármaco para alcanzar una actividad equivalente que la que exhibe el Benznidazol (Petray et al., 2004).

II.6.3 Avances en la Terapéutica

El conocimiento de la biología básica de *T. cruzi* permitirá el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, a continuación se mencionan algunas de las más relevantes:

1. Inhibidores de la biosíntesis de esteroides: *T. cruzi* requiere de esteroides específicos para la viabilidad celular y la proliferación en todos los estadios de su ciclo de vida, y es muy susceptible a los inhibidores de la biosíntesis de ergosterol que actúan a distintos niveles de la vía de la biosíntesis de esteroides. (Urbina y Docampo, 2003).
2. Inhibidores de proteasas de cisteína: *T. cruzi* contiene una proteasa de cisteína denominada cruzipaina, también conocida como gp51/57, la cual es responsable de la mayor parte de la actividad proteolítica que se presenta durante el ciclo de vida del parásito. Inhibidores selectivos de esta proteasa permiten bloquear la proliferación tanto de epimastigotes como de amastigotes, además de provocar un arresto en la metacicloogénesis (transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos), (Urbina y Docampo, 2003).
3. Inhibidores del metabolismo de pirofosfato: los tripanosomátidos y los parásitos apicomplexos contienen organelos especializados denominados acidocalcisomas, que están involucrados en el almacenamiento de polifosfatos y cationes y en la adaptación de estos parásitos al estrés ambiental. La toma de Ca^{2+} y su liberación de la matriz acidocalcisomal, está regulada por una serie de mecanismos entre los cuales se tiene:



ATPasa de Ca^{2+} , bomba Na^+/H^+ y H^+/ATPasa y pirofosfatasas. Los bifosfonatos, son selectivamente acumulados en el parásito y pueden inhibir enzimas involucradas en reacciones orgánicas e inorgánicas de pirofosfato, tales como la farnesyl – pirofosfato sintasa, esqualeno sintasa o pirofosfatasas de bombas de H^+ (Urbina y Docampo, 2003).

4. Inhibidores de almacenamiento de purinas: Los tripanosomátidos son deficientes en la síntesis de novo de purinas, toman estos compuestos esenciales a partir del medio de crecimiento. Una enzima clave en esta vía es la hipoxantina – guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), lo cual la convierte en un blanco clave para la terapéutica (Urbina y Docampo 2003).

Existen otras vías bioquímicas que han sido identificadas como importantes blancos quimioterapéuticos, entre las que se tiene: las enzimas involucradas en la síntesis y el metabolismo del tripanotión, la dihidrofolato reductasa que es una enzima que cataliza un paso crucial en la síntesis de novo de nucleótidos en los tripanosomátidos, y algunos análogos de fosfolípidos (Urbina y Docampo, 2003).

II.7 Diferencias de susceptibilidad a fármacos

Anteriormente se mencionó que el modo de reproducción de *T. cruzi* se considera esencialmente clonal; sin embargo, por medio de una serie de estudios realizados por Gaunt, se determinó que pueden ocurrir eventos de recombinación genética en el parásito en poblaciones naturales, generando así, genotipos híbridos. De esta manera algunas propiedades biológicas tales como la virulencia y la resistencia a fármacos pueden presentar una alta heterogeneidad entre cepas de *T. cruzi* (Gaunt et al., 2003).



Muchos autores han demostrado que la resistencia de las cepas a Benznidazol y Nifurtimox puede incrementarse cuando se aíslan a las cepas de ratones previamente tratados con estos fármacos. Veloso sugiere que el tratamiento inicial elimina a los parásitos sensibles preservando a los resistentes, que se multiplican y dominan dentro de la población (Veloso et al., 2001). Sin embargo, existen cepas que han sido caracterizadas como resistentes naturales a los fármacos, (Filardi y Brener, 1987) tal es el caso de la cepa Colombiana (Col) perteneciente al genotipo I.

Las diferencias que se llegan a dar en la susceptibilidad a fármacos por distintas cepas de *T. cruzi* ha sido muy estudiada. En un estudio realizado por Filardi y Brener, 1987, se reportó una alta variabilidad en la susceptibilidad a Benznidazol y Nifurtimox, y una posible relación con la distribución geográfica de las cepas; pero a su vez descartando una correlación con algunas características de las cepas tales como virulencia y patogenicidad. Posteriormente, con base en estudios realizados por Silvano, et al., 1998 se estableció que no necesariamente existe una correlación entre la susceptibilidad a Benznidazol y Nifurtimox y el área geográfica a la cual pertenezca la cepa. Finalmente, el estudio realizado por Villareal et al., 2004, se enfocó a correlacionar la susceptibilidad al Benznidazol y la diversidad genética de cepas (considerando la división del grupo genético II en sus subgrupos), que se encontraban en áreas geográficamente no muy alejadas unas de otras. En este estudio se demostró que no existe una correlación entre la susceptibilidad a fármacos y las distancias filogenéticas, y se encontró una alta variabilidad de susceptibilidad a fármacos dentro de cada genotipo.

La aparición de cepas de *T. cruzi* resistentes a los distintos tratamientos empleados (Nifurtimox y Benznidazol), puede ser uno de los principales argumentos que expliquen la falta de efectividad de éstos en algunos pacientes (Villareal et al., 2004).



III. JUSTIFICACIÓN

La Enfermedad de Chagas es considerada un problema de salud pública en América Latina ya que aproximadamente de 16 a 18 millones de personas se encuentran infectadas, de las cuales sólo un porcentaje muy bajo logra curarse dada la ineficiencia de la terapéutica existente. Los fármacos utilizados para tratar la enfermedad (Nifurtimox y Benznidazol) son eficientes en la etapa aguda de la enfermedad (logrando un 80% de la cura parasitológica), pero ineficientes en la etapa crónica. Lo anterior representa un problema, ya que la enfermedad es considerada mayormente asintomática en la fase aguda y muchas veces no logra detectarse sino hasta la etapa crónica. Además, la utilización de estos fármacos conlleva a la aparición de efectos adversos que traen como consecuencia la suspensión de los tratamientos. Las razones anteriormente mencionadas junto con la evidencia de una alta variabilidad en la susceptibilidad a fármacos que se llegan a presentar en las diferentes cepas de *T. cruzi*, hacen necesaria la búsqueda de una nueva estrategia terapéutica. El Etanidazol, que presenta pocos efectos adversos a dosis muy altas, presentó actividad sobre la cepa sudamericana RA de *T. cruzi*. Sin embargo es necesario determinar la actividad de este compuesto sobre cepas de otro grupo genético para determinar si efectivamente puede considerarse como un fármaco prometedor para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.



IV. HIPÓTESIS

Dado que se han observado diferencias biológicas entre las cepas Ninoa y Querétaro y que la susceptibilidad a fármacos es muy heterogénea entre cepas que pertenecen al mismo grupo genético, podrían existir diferencias de susceptibilidad al Etanidazol entre ellas.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general

Determinar si el Etanidazol presenta actividad contra cepas mexicanas de *T. cruzi* y evaluar si existen diferencias de susceptibilidad al fármaco entre ellas.

V.2 Objetivos particulares

Analizar si el Etanidazol presenta actividad contra tripomastigotes sanguíneos de las cepas mexicanas genotipo I Ninoa y Querétaro. Comparar el efecto con el observado con Nifurtimox y Benznidazol.

Evaluar si el Etanidazol presenta actividad contra amastigotes de las cepas Ninoa y Querétaro contenidos en macrófagos (células J 774). Comprobar el efecto con el observado con Nifurtimox y Benznidazol.



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Material Biológico

Las cepas utilizadas en este estudio fueron las cepas Ninoa y Querétaro. Esta elección se realizó en base a que estas son cepas mexicanas pertenecientes al genotipo I que se encuentran caracterizadas genética (Bosseno et al., 2001) y biológicamente, ya que se conocen algunas características como velocidad de crecimiento, infectividad in vitro realizada en células Vero, transformación de epimastigotes a tripomastigotes y virulencia, entre otras (López-Olmos et al., 1997). Los tripomastigotes de ambas cepas utilizados en este trabajo se cultivaron en el Laboratorio B11 del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM a cargo de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez. Los tripomastigotes de cultivo de ambas cepas fueron obtenidos a partir de cultivos de células Vero infectadas (Anexo A) mantenidas en medio D-MEM complementado con SFB al 10% (Anexo B) (López, 1999). Los tripomastigotes de sangre de ratón infectado fueron obtenidos a partir de ratón BALB/c, ya que esta cepa de ratón es relativamente susceptible a la infección con *T. cruzi*, en el día 28 post - infección en el caso de la cepa Ninoa y en el día 18 post - infección en el caso de la cepa Querétaro (Sosa, 2003).

VI.2 Fármacos

El Benznidazol y Nifurtimox fueron proporcionados por el Dr. Benjamín Noguera Torres de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. El Etanidazol (N – (2 – hidroxietil) – 2 – nitro – 1 – imidazolacetamida) fue proporcionado por la Dr. Patricia Petray y el Dr. Ricardo Corral, el cual a su vez fue donado por los Laboratorios Roche.



Las soluciones stock de Benznidazol y Nifurtimox fueron preparadas en DMSO y las soluciones stock de Etanidazol se prepararon en 10 mM TRIS, 0.85% NaCl, pH 7.4, de acuerdo a lo establecido por Petray et al., 2004. La concentración final de DMSO en los experimentos no debe ser mayor al 1%, pues a concentraciones mayores a ésta, el compuesto resulta ser tóxico para las células.

VI.3 Evaluación del efecto de fármacos sobre tripomastigotes sanguíneos

VI.3.1. Obtención de tripomastigotes sanguíneos

Se obtuvieron tripomastigotes de las cepas Ninoa y Querétaro a partir de sangre de ratón BALB/c infectado. Posteriormente, se realizó el conteo de parásitos en sangre utilizando la cámara de Neubauer (Bright Line 15170-172) (Anexo C). A partir del número de parásitos/mL de sangre determinado, se preparó una solución de parásitos en medio DMEM 10% SFB fresco a una densidad de 800,000 parásitos/mL en el caso de la cepa Querétaro y a una densidad de 400,000 parásitos/mL en el caso de la cepa Ninoa (del Olmo et al., 2001). La diferencia en el número de parásitos en solución entre las dos cepas se debió a que la parasitemia del ratón infectado con la cepa Ninoa es menor que la parasitemia del ratón infectado con la cepa Querétaro. Se sembraron 495 μ L de esta solución de parásitos para el ensayo con Nifurtimox y Benznidazol, y 450 μ L para el ensayo con Etanidazol, en cada uno de los 12 pozos de una placa de 24 pozos (COSTAR 3524), éstos volúmenes se completarán a 500 μ L tras la adición de los fármacos, teniendo finalmente 400,000 parásitos/pozo en el caso de la cepa Querétaro y 200,000 parásitos/pozo en el caso de la cepa Ninoa. Se adicionó agua estéril a los pozos restantes para evitar la evaporación de las soluciones de parásitos.



VI.3.2 Determinación del efecto de los fármacos sobre el número y movilidad de tripomastigotes sanguíneos

Se adicionaron 5 μL de las soluciones de Nifurtimox y Benznidazol y 50 μL de la solución de Etanidazol, de manera que las concentraciones finales de estos fármacos en los pozos fueron las siguientes: 1.48 μM , 4.4 μM , 13.3 μM , 40 μM y 120 μM en el caso de Nifurtimox y Benznidazol y de 14.8 μM , 44 μM , 133 μM , 400 μM y 1200 μM en el caso de Etanidazol. En los pozos controles (sin tratamiento) se adicionaron 5 μL de DMSO en el caso de los controles para Nifurtimox y Benznidazol, y 50 μL de 10 mM TRIS, 0.85% NaCl, pH 7.4 en el caso de los controles para Etanidazol. Se incubaron las placas a 37° C, 5% CO₂ y 90% de humedad relativa durante 24 y 48 horas en el caso de la cepa Querétaro, y durante 24 horas en el caso de la cepa Ninoa. Después de transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el conteo de parásitos móviles, inmóviles y muertos en presencia de azul tripano y fue determinado el valor de DL₅₀, el cual es definido como la concentración de fármaco que reduce en un 50% el número de tripomastigotes sanguíneos comparados con el control (Petray et al., 2004; Velasco et al., 2003).

VI.3.3. Determinación del efecto de fármacos sobre la morfología de tripomastigotes sanguíneos

Se tomó una alícuota de 2.5 μL del cultivo de tripomastigotes (después de transcurridas las 24 y 48 horas de incubación), se realizó un frotis sobre un portaobjetos (Corning 2947) y se dejó secar al aire. Ya seca la muestra, ésta se fijó con metanol, se dejó secar al aire el metanol y finalmente se tiñó con solución de trabajo Giemsa (Anexo D) durante 15 minutos. La laminilla se lavó con agua corriente y se dejó secar al aire. Una vez seca, se observó al microscopio óptico Microstar IV (100x), y se determinó el número de tripomastigotes con morfología normal y anormal



en 20 campos de cada una de las muestras. Posteriormente se fotografiaron algunas laminillas representativas en un microscopio Opyiphoy-2 de Nikon con cámara Coolpix 4300 de Nikon y finalmente las fotografías fueron editadas con el programa Adobe Photoshop 7.0.

VI.4 Evaluación del efecto de fármacos sobre amastigotes intracelulares

VI.4.1 Procedimiento de infección “in vitro”

Se obtuvieron células J774 a partir de cultivos mantenidos a 37° C, 5% CO₂ y 90% de humedad despegándolas con EDTA 5 mM (Anexo A.1) e incubándolas a 37° C, 5% CO₂ y 90% humedad durante 30 minutos. Después, éstas se resuspendieron en medio D-MEM fresco con 10% SFB y se centrifugaron a 560 g, 4° C durante 10 minutos. Se resuspendió el pellet de células obtenido y se realizó un conteo de las células presentes en el resuspendido empleando la cámara de Neubauer (Bright Line 15170-172). En base al conteo de células realizado, se preparó una solución de células a una densidad de 6000 células/mL. Finalmente se sembraron 30 µL de esta solución de células (180 células/pozo) en cada uno de los pozos de una laminilla de teflón de 18 pozos (Cell – line 10 – 476) contenida en una caja Petri. Las laminillas contenidas en la caja fueron previamente tratadas y esterilizadas (Anexo E) y se agregan aproximadamente 2 mL de agua estéril sobre el papel filtro contenido en la caja Petri para evitar la evaporación de la solución de células. Se dejaron adherir las células durante 3 horas aproximadamente incubando a 37° C, 5% CO₂ y 90% humedad (Jiménez, 2005).

Una vez transcurrido el tiempo de adhesión de las células, se obtuvieron tripomastigotes a partir de células Vero infectadas como se menciona a continuación. Se recoge el sobrenadante de las células Vero infectadas con *T. cruzi* (cepas Ninoa o Querétaro) y se centrifuga a 560 g, 4° C durante 10 minutos. El pellet resultante se



resuspendió en 1 mL de medio D-MEM fresco con 10% SFB y se contaron el número de parásitos presentes en el resuspendido empleando la cámara de Neubauer (Bright Line 15170-172). A partir del número de parásitos/mL, se preparó una solución de parásitos en medio D-MEM 10% SFB a razón 10:1 con respecto a las células. Ya obtenida la solución de parásitos, se removió el medio que se encontraba en cada uno de los pozos de la laminilla. Posteriormente, se sembraron 30 μ L de la solución de parásitos (1800 parásitos/pozo) en cada uno de los pozos de la laminilla y se incubaron a 37° C, 5% CO₂ y 90% humedad durante 24 horas (Jiménez, 2005),

VI.4.2 Tratamiento con Benznidazol, Nifurtimox y Etanidazol

Después de finalizado el proceso de infección (24 horas) se removió el medio con los parásitos que no hayan infectado las células, a su vez, cada uno de los pozos se lavaron con PBS 1X 6 veces. Posterior al lavado, se adicionaron las soluciones de los diferentes fármacos en medio D-MEM 10% SFB, de manera que éstos se encontraban a las siguientes concentraciones: 0.3 μ M, 0.9 μ M, 2.7 μ M, 8.1 μ M y 24.3 μ M en el caso de Benznidazol y Nifurtimox y 3 μ M, 9 μ M, 27 μ M, 81 μ M y 243 μ M en el caso de Etanidazol. Finalmente las células infectadas y tratadas con los fármacos se incubaron a 37° C, 5% CO₂ y 90% humedad durante 72 horas (Petray et al., 2004).

VI.4.3 Determinación del número de células infectadas y el número de amastigotes intracelulares

Una vez transcurridas las 72 horas de incubación con el fármaco, se removió la solución contenida en cada uno de los pozos de las laminillas; se lavaron 10 veces con PBS 1x y se fijaron sumergiéndolas en una caja Coplin conteniendo metanol durante 5 minutos. Se dejaron secar las laminillas al aire y finalmente se tiñeron con solución de trabajo Giemsa durante 15 minutos (Jiménez, 2005). Las laminillas se enjuagaron con



agua corriente, se dejaron secar al aire y finalmente se observaron al microscopio óptico Microstar IV (100x). Se contaron un total de 100 células en cada uno de los pozos y de éstas se determinó el número de células que se encontraban infectadas y el número total de amastigotes por cada 100 células para determinar el porcentaje de actividad Anti - amastigote. El porcentaje de actividad Anti - amastigote (%AA) fue determinado de acuerdo a lo propuesto por Petray et al., 2004, la fórmula aparece a continuación:

$$\%AA = \left[1 - \frac{\text{número de amastigotes} / 100 \text{ células tratados}}{\text{número de amastigotes} / 100 \text{ células control}} \right] * 100$$

Posteriormente se fotografiaron algunas laminillas representativas en un microscopio Opyiphoy-2 de Nikon con cámara Coolpix 4300 de Nikon y finalmente las fotografías fueron editadas con el programa Adobe Photoshop 7.0. Además fue determinado el valor de CI_{50} la cual es definida como la concentración de fármaco requerida para alcanzar el 50% de inhibición del crecimiento intracelular de los amastigotes (Petray et al., 2004; Velasco et al., 2003).

VI.5 Estadística

Todos los ensayos fueron realizados por duplicado y se realizaron 3 experimentos independientes. Los resultados fueron analizados con las pruebas estadísticas de t pareada y t student considerando que existen diferencias significativas cuando $p < 0.05$. La prueba t pareada nos permite correlacionar observaciones relacionadas que se obtienen de muestras no independientes y nos permite averiguar sobre la efectividad de un tratamiento. La prueba t student nos permite relacionar dos muestras independientes (Wayne, 1979). Las gráficas mostradas en los resultados se reportaron en porcentaje de parásitos vivos; sin



embargo, las pruebas estadísticas fueron realizadas considerando el número total de parásitos.

La determinación de la Dosis Letal Media (LD_{50}) y Concentración Inhibitoria 50 (IC_{50}) fueron determinadas por el método Probit (Anexo F).

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa StatsDirect Statistical Software versión 2.5.6 (University of Liverpool, United Kingdom).



VII. RESULTADOS

VII.1 Efecto de fármacos sobre tripomastigotes sanguíneos de la cepa Querétaro

VII.1.1 Efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre el número de parásitos

Se realizó el conteo de tripomastigotes totales (móviles e inmóviles) en presencia de azul tripano a las 24 y 48 horas después de aplicado el tratamiento correspondiente. Se observó una disminución en el porcentaje de parásitos totales (móviles e inmóviles) a medida que aumentó la concentración de los fármacos y el tiempo de exposición a éstos. De acuerdo a la prueba t pareada (5% significancia StatsDirect Statistical Software versión 2.5.6) se determinó que existían diferencias significativas entre el porcentaje de parásitos vivos sin tratamiento y el porcentaje de parásitos vivos enfrentados a las concentraciones 4.4 μM , 13.3 μM , 40 μM y 120 μM a las 24 y 48 horas para ambos tratamientos (Figura 10).

Se realizó una comparación del porcentaje de parásitos vivos tratados con Nifurtimox y el porcentaje parásitos vivos tratados con Benznidazol a ambos tiempos de exposición (24 y 48 horas), para corroborar si existían diferencias significativas entre ambos tratamientos. De acuerdo a la prueba t – student se determinó que no existen diferencias significativas en el porcentaje de parásitos vivos cuando se compararon las mismas concentraciones de Benznidazol y Nifurtimox a las 24 y 48 horas, por lo cual ambos fármacos presentaron el mismo comportamiento sobre los parásitos.

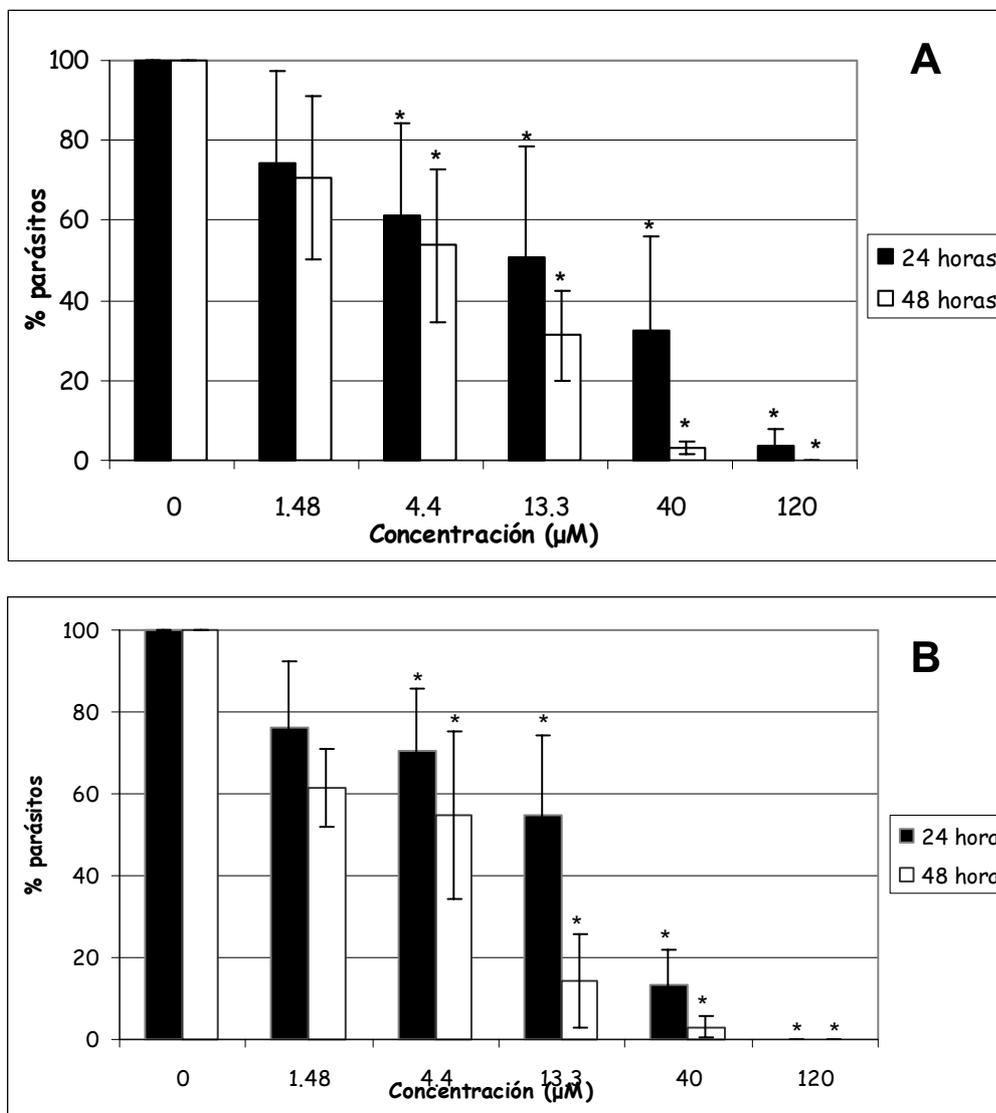


Figura 10. Efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre el número de tripomastigotes sanguíneos expresados en porcentaje con respecto al control de la cepa Querétaro. Tripomastigotes obtenidos de sangre de ratón infectado fueron sembrados en una placa de 24 pozos (400,000 tripomastigotes/pozo) y enfrentados a las siguientes concentraciones de Benznidazol (**A**) y Nifurtimox (**B**): 0 μM , 1.48 μM , 4.4 μM , 13.3 μM , 40 μM y 120 μM durante 24 y 48 horas. El asterisco (*) muestra las concentraciones a las cuales se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de parásitos vivos enfrentados a la concentración correspondiente y el porcentaje de parásitos del control (sin tratamiento).



VII.1.2 Efecto de Etanidazol sobre el número de parásitos

Se realizó el conteo de tripomastigotes totales enfrentados a distintas concentraciones de Etanidazol en presencia de azul tripano a las 24h y 48h. Se observó sólo una ligera disminución en el porcentaje de parásitos vivos a medida que aumentó la concentración del fármaco y ésta fue menor a la observada en el caso de los parásitos tratados con Nifurtimox y Benznidazol. De acuerdo a la prueba t pareada se determinó que no existían diferencias significativas entre el porcentaje de parásitos vivos sin tratamiento y el porcentaje de parásitos vivos enfrentados a las distintas concentraciones del fármaco, lo cual indicó que el Etanidazol no presenta efecto sobre los tripomastigotes de la cepa Querétaro (Figura 11).

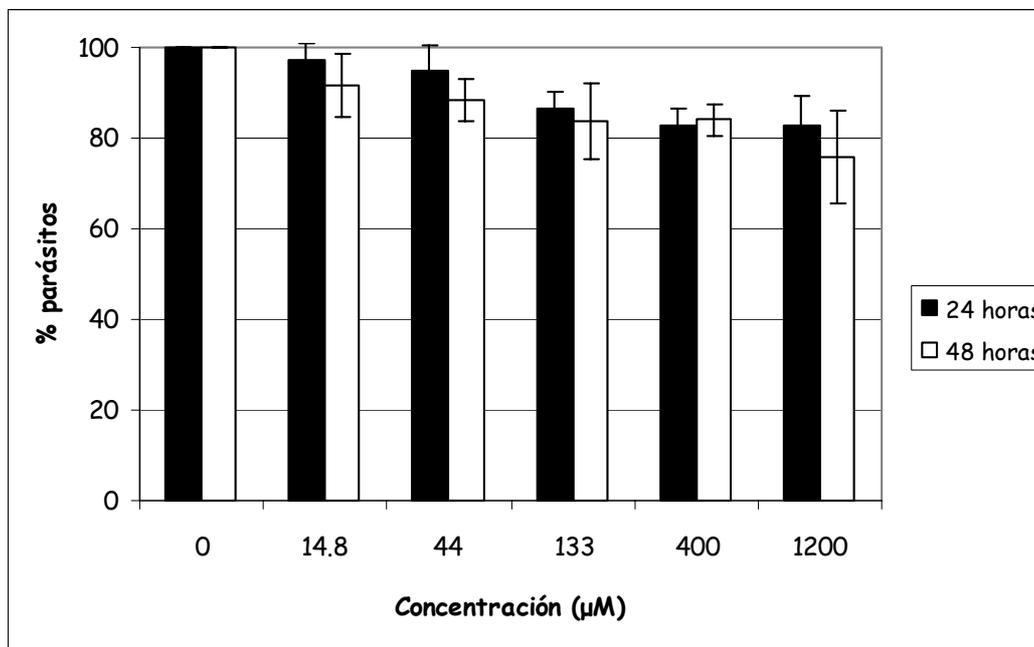


Figura 11. Efecto del Etanidazol sobre el número de tripomastigotes sanguíneos expresados en porcentaje con respecto al control de la cepa Querétaro. Tripomastigotes obtenidos de sangre de ratón infectado fueron sembrados en una placa de 24 pozos (400,000 tripomastigotes/pozo) y enfrentados a las siguientes concentraciones de Etanidazol: 0 μM , 14.8 μM , 44 μM , 133 μM , 400 μM y 1200 μM durante 24 y 48 horas.



VII.1.3 Efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre la movilidad

Se realizó el conteo de parásitos móviles a las 24h y 48h después de aplicados ambos tratamientos. Se observó una disminución en la movilidad de los parásitos a medida que aumentó la concentración de los fármacos y el tiempo de exposición a éstos. De acuerdo a la prueba t pareada se determinó que existían diferencias significativas entre el porcentaje de movilidad sin tratamiento y el porcentaje de movilidad de los parásitos enfrentados a las concentraciones 40 μM y 120 μM a las 24 horas y a las concentraciones 13.3 μM , 40 μM y 120 μM a las 48 horas respecto al tratamiento con Benznidazol. Con el tratamiento con Nifurtimox existieron diferencias significativas a las concentraciones 13.3 μM , 40 μM y 120 μM a las 24 y 48 horas (Figura 12). Se realizó además una comparación entre ambos tratamientos, y se observó una mayor sensibilidad de la movilidad de los parásitos al tratamiento con Nifurtimox tanto a las 24 como a las 48 horas. De acuerdo a la prueba estadística t – student, se determinó que existían diferencias significativas entre ambos tratamientos a las concentraciones 13.3 μM y 40 μM a las 24 horas y a la concentración 13.3 μM a las 48 horas, siendo mayor la sensibilidad a Nifurtimox.

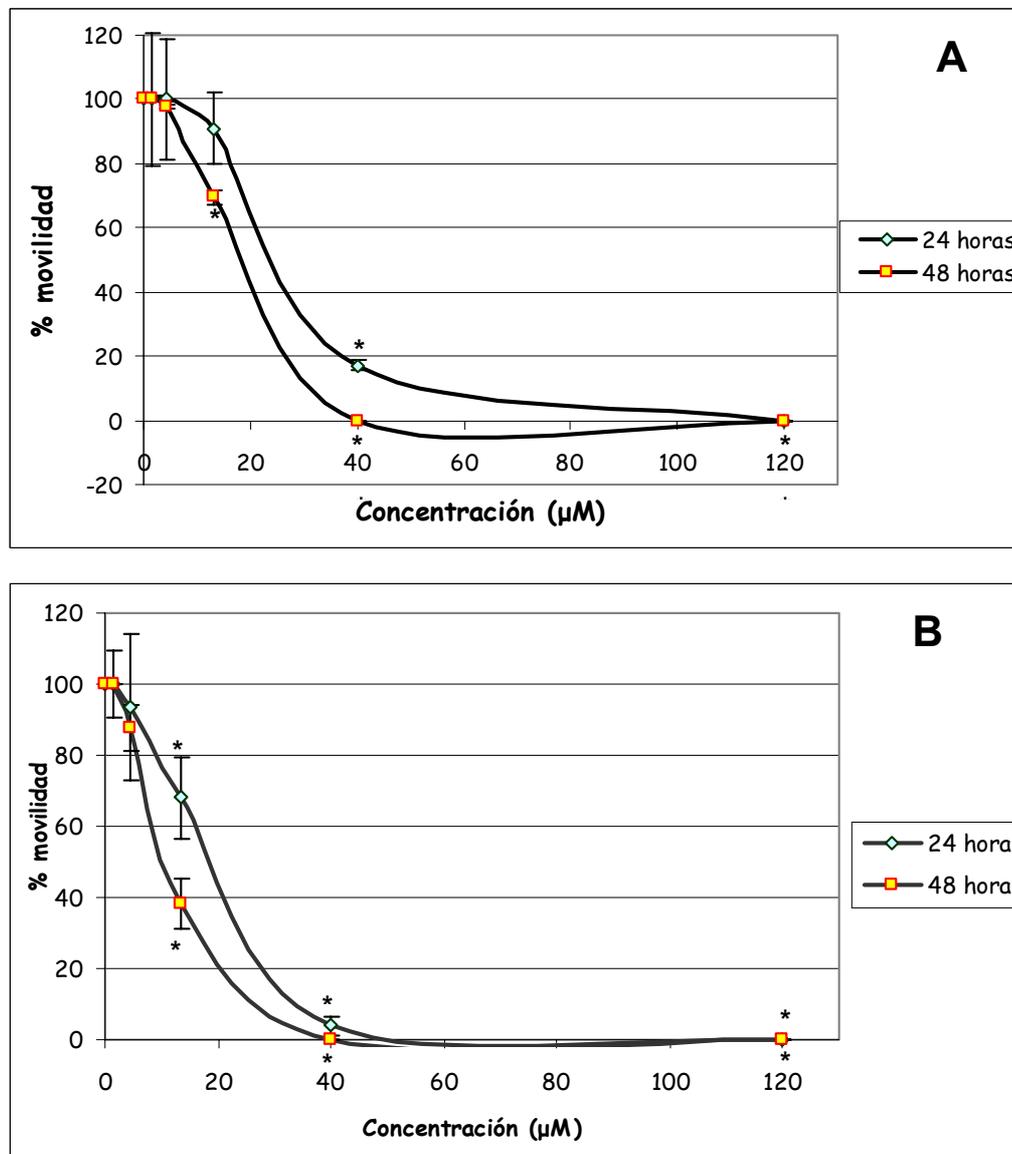


Figura 12. Efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre la movilidad de tripomastigotes sanguíneos expresados en porcentaje con respecto al control de la cepa Querétaro. Tripomastigotes obtenidos de sangre de ratón infectado fueron sembrados en una placa de 24 pozos (400,000 tripomastigotes/pozo) y enfrentados a las siguientes concentraciones de Benznidazol (**A**) y Nifurtimox (**B**): 0 μM , 1.48 μM , 4.4 μM , 13.3 μM , 40 μM y 120 μM durante 24 y 48 horas. El porcentaje de movilidad se determinó relacionando el número de parásitos móviles contados con el número de parásitos totales. El asterisco (*) muestra las concentraciones a las cuales se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de parásitos vivos enfrentados a la concentración correspondiente y el porcentaje de parásitos del control (sin tratamiento).



VII.1.4 Efecto de Etanidazol sobre la movilidad

Se realizó el conteo de parásitos móviles a las 24h y 48h postratamiento. Se observó una ligera disminución en el porcentaje de movilidad a medida que aumentó la concentración del fármaco y el tiempo de exposición a éste. De acuerdo a la prueba t pareada se determinó que no existían diferencias significativas entre el porcentaje de movilidad sin tratamiento y el porcentaje de movilidad enfrentado a las distintas concentraciones del fármaco, lo cual indica que éste no presenta efecto sobre la movilidad de los parásitos (Figura 13).

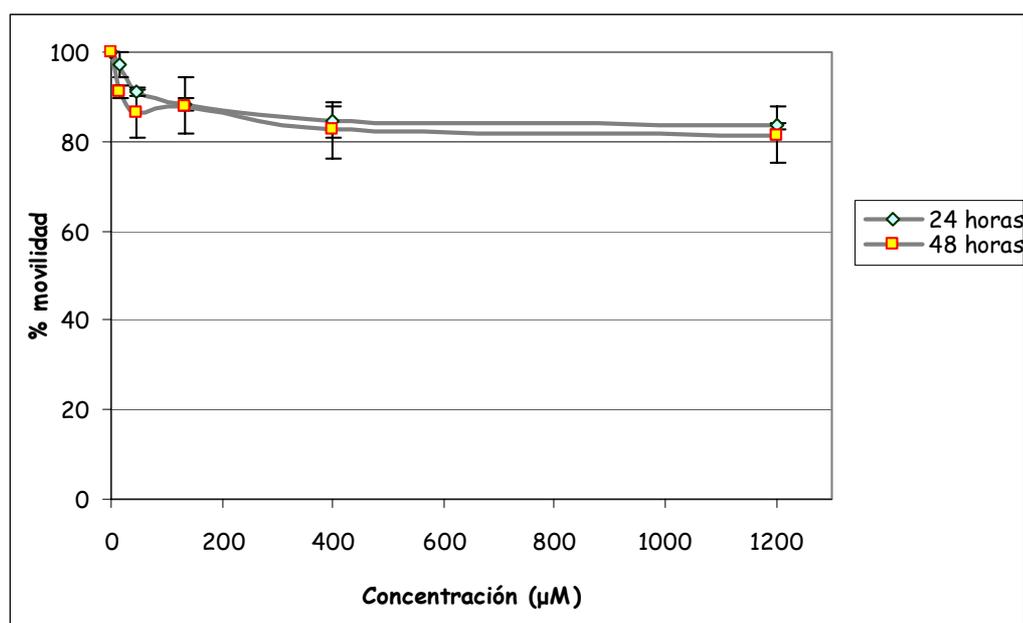


Figura 13. Efecto del Etanidazol sobre la movilidad de tripomastigotes sanguíneos expresados en porcentaje con respecto al control de la cepa Querétaro. Tripomastigotes obtenidos de sangre de ratón infectado fueron sembrados en una placa de 24 pozos (400,000 tripomastigotes/pozo) y enfrentados a las siguientes concentraciones de Etanidazol: 0 µM, 14.8 µM, 44 µM, 133 µM, 400 µM y 1200 µM durante 24 y 48 horas. El porcentaje de movilidad se determinó relacionando el número de parásitos móviles contados con el número de parásitos totales



VII.1.5 Efecto de fármacos sobre la morfología de tripomastigotes

Se observó una alteración en la morfología de los tripomastigotes a medida que aumenta la concentración y el tiempo de exposición a los fármacos. Los cambios morfológicos observados pudieron ser descritos como aumento de tamaño del parásito, desaparición del flagelo, observación de gránulos y vacuolas, desintegración del núcleo y el cinetoplasto, observándose muy pocas de estas anomalías en los parásitos tratados con Etanidazol (Figura 14). Se cuantificaron los parásitos con morfología anormal, observándose un aumento en el porcentaje de parásitos con morfología anormal a medida que aumentaron las concentraciones de Benznidazol y Nifurtimox, a diferencia del tratamiento con Etanidazol con el cual no se observó un aumento significativo de parásitos con morfología anormal. Se construyeron las gráficas correspondientes a los tratamientos con Benznidazol, Nifurtimox y Etanidazol para visualizar la relación dosis – respuesta reflejada en la alteración en la morfología de los parásitos (Figura 15). Se observó un 100% de parásitos con morfología anormal a la concentración 40 μM a las 48 horas y a la concentración 120 μM a las 24 horas respecto al tratamiento con Benznidazol, mientras que el 100% de parásitos con morfología anormal se observó a la concentración 40 μM a las 24 horas respecto al tratamiento con Nifurtimox, y a las 48 horas ya no fue posible observar parásitos. El porcentaje de parásitos tratados con Etanidazol con morfología anormal no fue mayor a 40% en las concentraciones más altas y tiempos de exposición mayores.

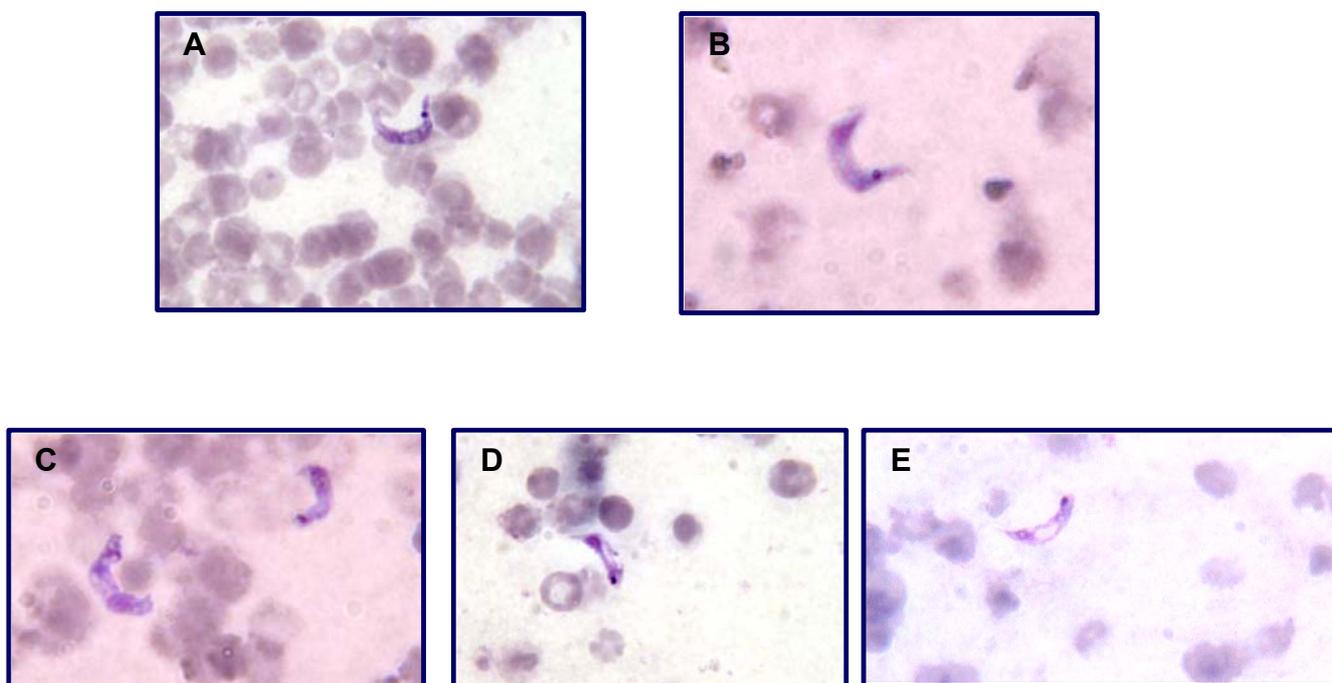


Figura 14. Alteraciones morfológicas de tripomastigotes sanguíneos de la cepa Querétaro. Las observaciones fueron realizadas a microscopio óptico (100x). (A) Se observa un tripomastigote con morfología clásica, al cual no se le aplicó tratamiento. (B) Tripomastigote tratado con Etanidazol 40 μM durante 24 horas. (C) Tripomastigote tratado con Nifurtimox 4.4 μM durante 24 horas. (D) Tripomastigote tratado con Benznidazol 120 μM durante 24 horas. (E) Tripomastigote tratado con Nifurtimox 120 μM durante 24 horas.

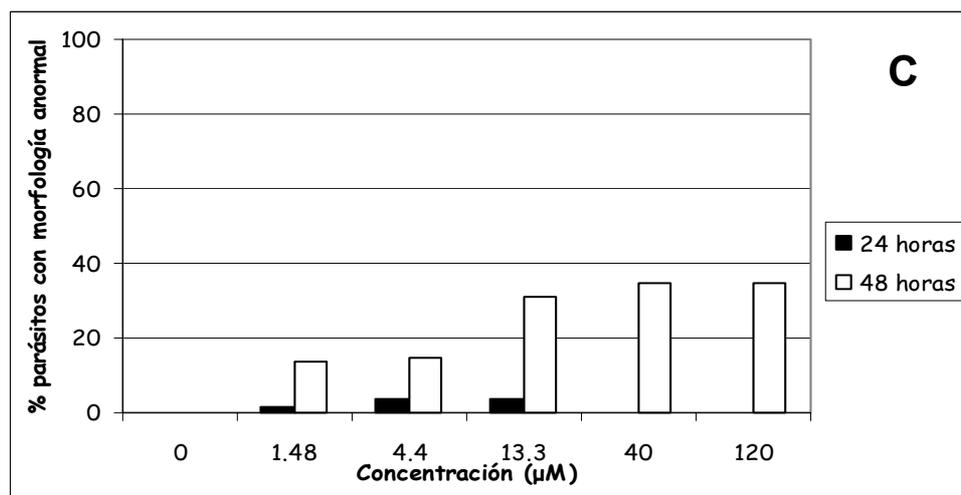
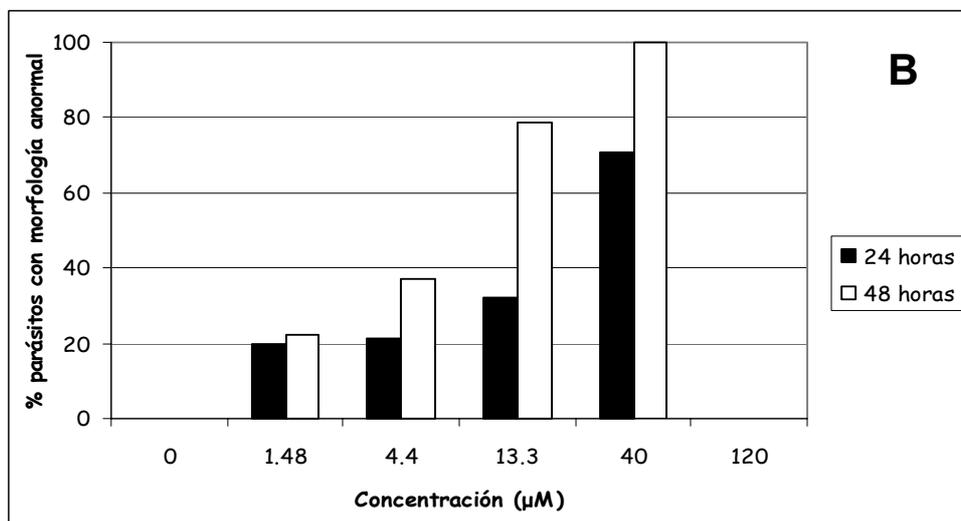
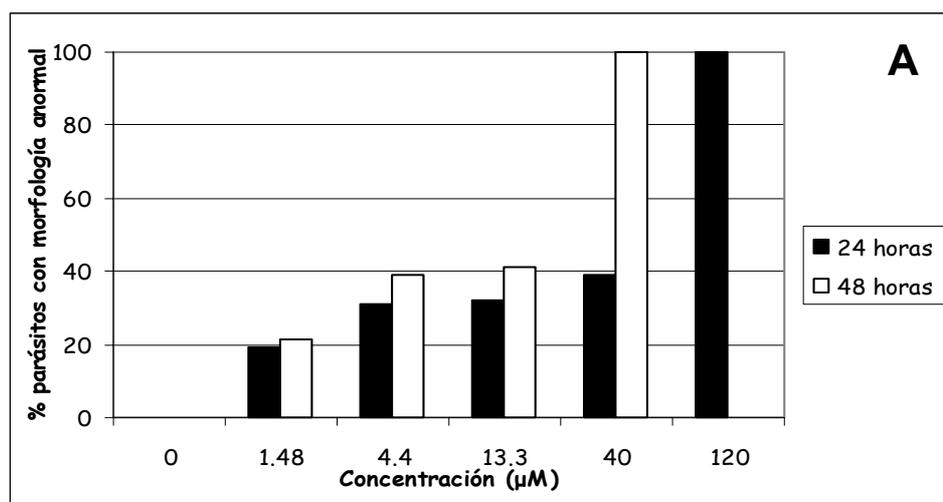


Figura 15. Efecto de Benznidazol, Nifurtimox y Etanidazol sobre la morfología de tripomastigotes sanguíneos de la cepa Querétaro. Tripomastigotes obtenidos de sangre de ratón infectado de la cepa Querétaro fueron sembrados en una placa de 24 pozos (400,000 tripomastigotes/pozo) y enfrentados a distintas concentraciones de (A) Benznidazol, (B) Nifurtimox y (C) Etanidazol durante 24 y 48 horas. Se realizó un frotis con Giemsa del contenido de cada uno de los pozos y se realizó el conteo de tripomastigotes con morfología normal y anormal en 20 campos (100x).



VII.2 Efecto de fármacos sobre tripomastigotes sanguíneos de la cepa Ninoa

VII.2.1 Efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre el número de parásitos

Se realizó el conteo de tripomastigotes a las 24 horas después de aplicado el tratamiento correspondiente en presencia de azul tripano. Se observó una disminución en el número de parásitos móviles pero no se observaron parásitos inmóviles. El número de parásitos móviles fue considerado como el número de parásitos totales. De acuerdo a la prueba t pareada se determinó que existieron diferencias significativas entre el porcentaje de parásitos vivos sin tratamiento y el porcentaje de parásitos vivos enfrentados a las cinco concentraciones de Benznidazol y Nifurtimox (1.48 μM , 4.4 μM , 13.3 μM , 40 μM y 120 μM) (Figura 16). Al igual que con la cepa Querétaro, se realizó una comparación del porcentaje de parásitos tratados con Nifurtimox y el porcentaje de parásitos tratados con Benznidazol, para corroborar si existían diferencias significativas entre ambos tratamientos. Con base en la prueba t – student se determinó que no existen diferencias significativas en el porcentaje de parásitos vivos entre las mismas concentraciones de Benznidazol y Nifurtimox a las 24 horas, por lo que los parásitos se comportaron de la misma manera ante ambos fármacos. No fue posible realizar los conteos de parásitos a las 48 horas, ya que los tripomastigotes de esta cepa no pudieron ser mantenidos hasta este tiempo de incubación pues se lisaron; sin embargo, a las 24 horas se encontraban en óptimas morfológicas y de movilidad (de acuerdo a lo observado en el control) para realizar el estudio.

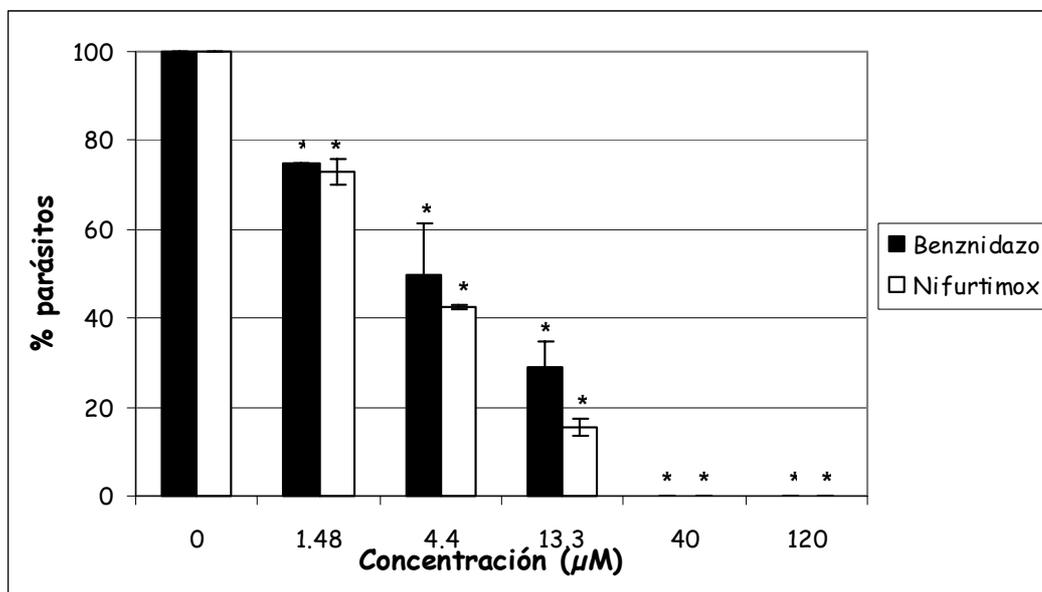


Figura 16. Efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre el número de tripomastigotes sanguíneos expresados en porcentaje con respecto al control de la cepa Ninoa. Tripomastigotes obtenidos de sangre de ratón infectado fueron sembrados en una placa de 24 pozos (200,000 tripomastigotes/pozo) y enfrentados a las siguientes concentraciones de Benznidazol (A) y Nifurtimox (B): 0 µM, 1.48 µM, 4.4 µM, 13.3 µM, 40 µM y 120 µM durante 24 y 48 horas. El asterisco (*) muestra las concentraciones a las cuales se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de parásitos vivos enfrentados a la concentración correspondiente y el porcentaje de parásitos del control (sin tratamiento).

VII.2.2 Efecto de Etanidazol sobre el número de parásitos

Se realizó el conteo de tripomastigotes enfrentados a las distintas concentraciones del fármaco en presencia de azul tripano a las 24h, a las 48 horas no fue posible realizar el conteo ya que los parásitos morían sin ser incubados con algún fármaco. Se observó una disminución en el porcentaje de parásitos a partir de la concentración 133 µM; sin embargo, fue más notoria a la concentración 1200 µM. Con base en la prueba t pareada se determinó que sólo existían diferencias significativas entre el porcentaje de parásitos vivos sin tratamiento y el porcentaje de parásitos vivos enfrentados a la concentración 1200 µM de Etanidazol (Figura 17).

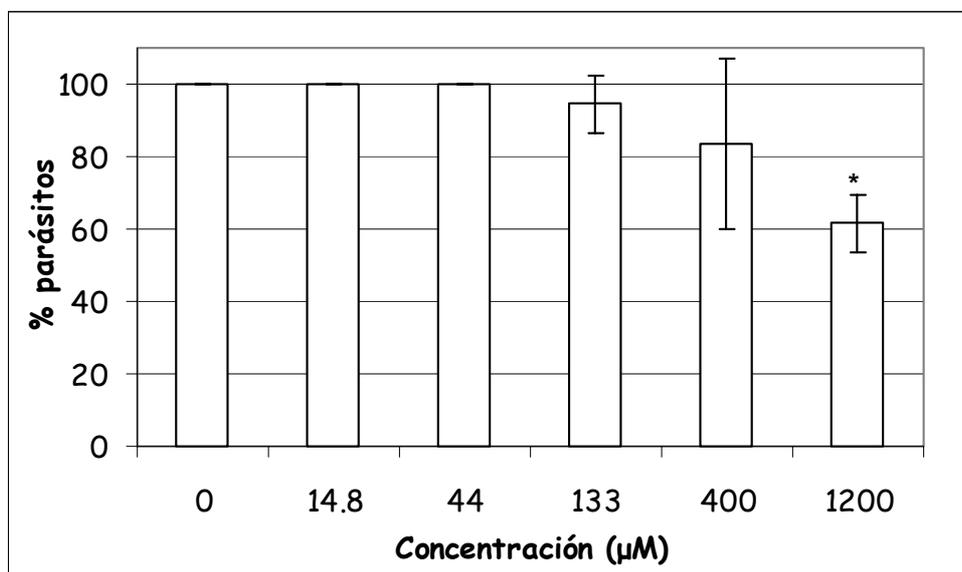


Figura 17. Efecto del Etanidazol sobre el número de tripomastigotes sanguíneos expresados en porcentaje con respecto al control de la cepa Ninoa. Tripomastigotes obtenidos de sangre de ratón infectado fueron sembrados en una placa de 24 pozos (200,000 tripomastigotes/pozo) y enfrentados a las siguientes concentraciones de Etanidazol: 0 µM, 14.8 µM, 44 µM, 133 µM, 400 µM y 1200 µM durante 24 y 48 horas. El asterisco (*) muestra las concentraciones a las cuales se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de parásitos vivos enfrentados a la concentración correspondiente y el porcentaje de parásitos del control (sin tratamiento).

VII.2.3 Efecto de fármacos sobre la movilidad y morfología de tripomastigotes

En el caso de la cepa Ninoa todos los parásitos observados en cada una de las concentraciones de los tres fármacos eran parásitos móviles y por razones del escaso número de tripomastigotes que se pudieron obtener, no se realizó el estudio sobre cambios en su morfología.

VII.3 Determinación de DL₅₀ para tripomastigotes de las cepas Ninoa y Querétaro

La determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀) fue realizada en base a los resultados correspondientes al conteo de parásitos totales mediante el Método Probit (Anexo F). Esta determinación no pudo ser realizada para el tratamiento con



Etanidazol, ya que la disminución en el porcentaje de parásitos nunca llegó al 50%. Las concentraciones DL₅₀ necesarias para inhibir el crecimiento, fueron menores para el tratamiento correspondiente con Nifurtimox para ambas cepas, lo cual indicó que resultaron ser más sensibles al tratamiento con Nifurtimox. En el caso de la cepa Ninoa se observaron concentraciones menores en comparación con la cepa Querétaro, por lo cual esta cepa resultó ser más sensible al tratamiento con ambos fármacos (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de DL₅₀ de Benznidazol y Nifurtimox para inhibir el crecimiento de tripomastigotes sanguíneos		
Efecto sobre tripomastigotes de la cepa Querétaro		
Tiempo de Exposición	Tratamiento	DL ₅₀ (µM)
24 horas	Benznidazol	19.80
	Nifurtimox	12.98
48 horas	Benznidazol	6.24
	Nifurtimox	3.16
Efecto sobre tripomastigotes de la cepa Ninoa		
Tiempo de Exposición	Tratamiento	DL ₅₀ (µM)
24 horas	Benznidazol	6.59
	Nifurtimox	4.63

Valores de DL₅₀ correspondientes al efecto de los fármacos sobre tripomastigotes sanguíneos. Los valores fueron determinados por el método Probit.

VII.4 Comparación del efecto de fármacos sobre el número de tripomastigotes sanguíneos de las cepas Ninoa y Querétaro

Se llevó a cabo una comparación del efecto del Benznidazol, Nifurtimox y Etanidazol sobre el número de tripomastigotes de ambas cepas con la finalidad de corroborar si existían diferencias en la respuesta de éstas a los distintos fármacos. La comparación de respuestas fue realizada sólo con los resultados obtenidos a las 24



horas ya que en el caso de la cepa Ninoa no fue posible observar efectos de los fármacos a las 48 horas.

Al realizar la comparación del efecto sobre el número de parásitos, se pudo observar que la cepa Ninoa resultó ser más sensible al efecto de los fármacos que la cepa Querétaro. De acuerdo al análisis estadístico (prueba t student) sólo se observaron diferencias significativas entre cepas a la concentración 40 μM respecto al tratamiento con Benznidazol, mientras que en el tratamiento con Nifurtimox se observaron diferencias significativas a las concentraciones 13.3 μM y 40 μM . En el tratamiento con Etanidazol, sólo se observaron diferencias significativas en la concentración de 1200 μM (Figura 18).

No se realizó una comparación del efecto de los fármacos sobre la movilidad de los parásitos, ya que no se observaron efectos sobre la movilidad de la cepa Ninoa y sólo presentaron efecto sobre la movilidad de la cepa Querétaro.

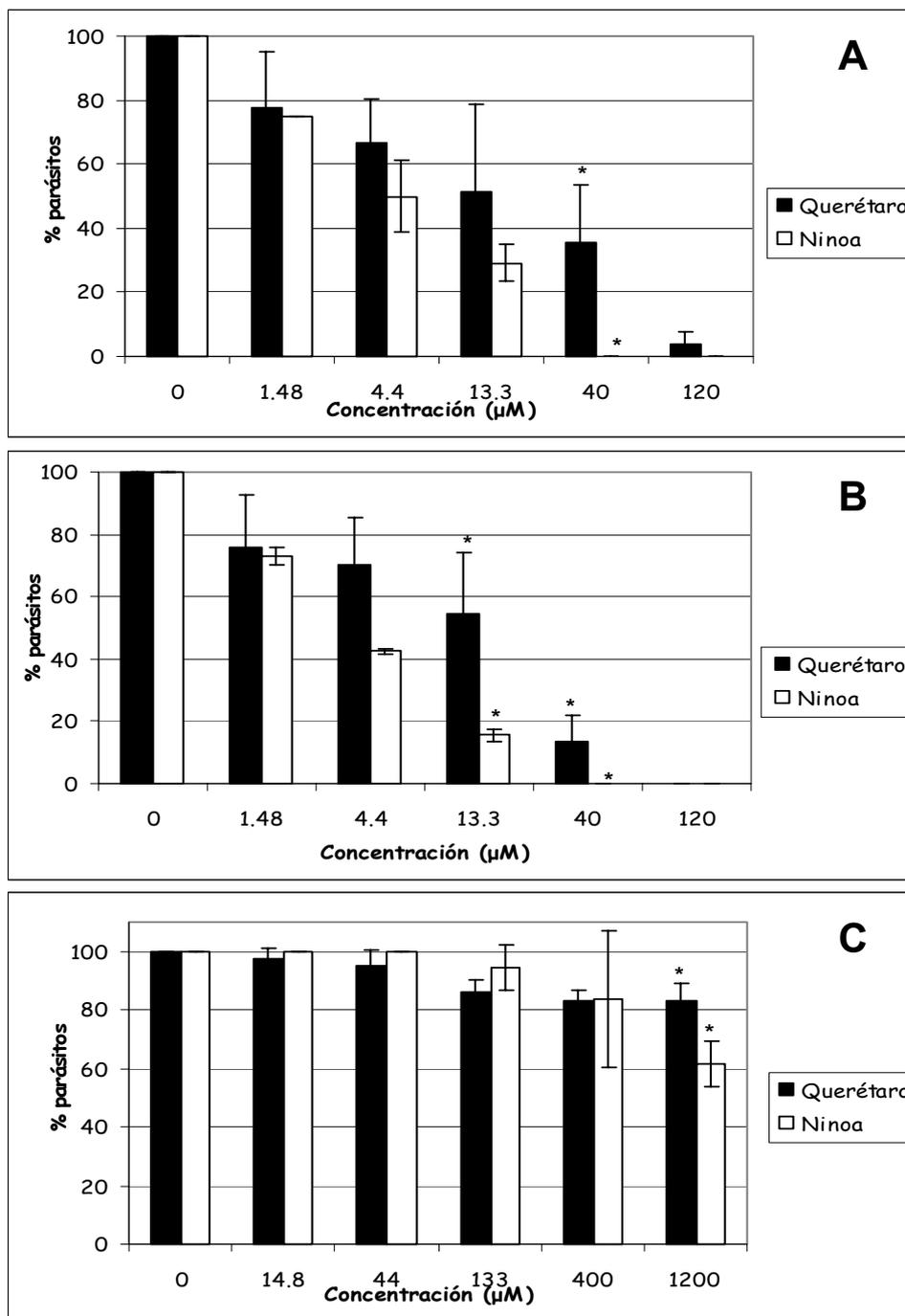


Figura 18. Comparación de la relación dosis – respuesta reflejada en la disminución del número de tripomastigotes sanguíneos entre las cepas Querétaro y Ninoa. Los tratamientos correspondientes son los siguientes: **(A)** Benznidazol, **(B)** Nifurtimox y **(C)** Etanidazol. El asterisco (*) muestra las concentraciones a las cuales se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de parásitos de la cepa Ninoa y el porcentaje de parásitos de la cepa Querétaro.



VII.5 Efecto de fármacos sobre amastigotes intracelulares de la cepa Querétaro

VII.5.1 Efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre el número de células infectadas

Se realizó el conteo de células infectadas por cada 100 células después de 72 horas de aplicado el tratamiento correspondiente. Se observó una disminución en el número de células infectadas a medida que aumentó la concentración de los fármacos. De acuerdo a la prueba t pareada se determinó que existen diferencias significativas entre el número de células infectadas sin tratamiento y el número de células infectadas incubadas con las siguientes concentraciones de ambos fármacos. 0.9 μM , 2.7 μM , 8.1 μM y 24.3 μM . Además se realizó una comparación entre el número de células infectadas correspondientes a ambos tratamientos para corroborar si existían diferencias significativas entre ambos. De acuerdo a la prueba t – student se observaron diferencias significativas del efecto entre ambos fármacos a la concentración 2.7 μM (Figura 19).

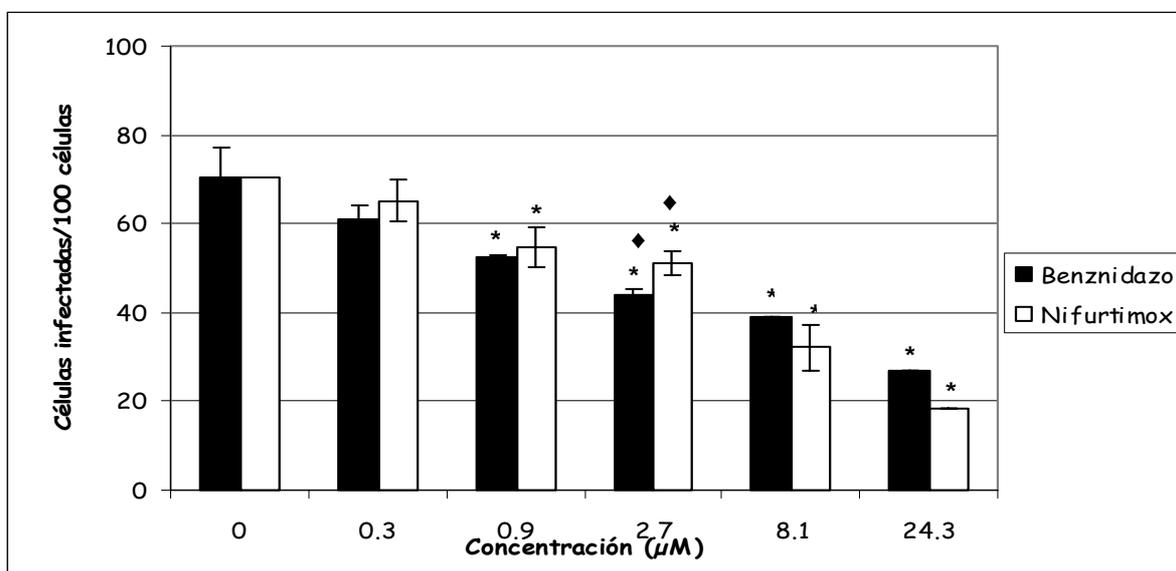


Figura 19. Efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre el número de células infectadas con amastigotes de la cepa Querétaro. Macrófagos (J774) fueron infectados con tripomastigotes de la cepa Querétaro en una relación 1:10 durante 24 horas en una laminilla de 18 pozos. Se removieron los parásitos extracelulares y se incubaron los macrófagos infectados con las siguientes concentraciones de Benznidazol y Nifurtimox: 0.3 μM , 0.9 μM , 2.7 μM , 8.1 μM y 24.3 μM , por 72 horas. Se realizó una tinción con Giemsa de la laminilla y se determinó el número de células infectadas/100 células en un microscopio óptico (100x) Microstar IV. El asterisco (*) muestra las concentraciones a las cuales se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de parásitos vivos enfrentados a la concentración correspondiente y el porcentaje de parásitos del control (sin tratamiento). El símbolo (♦) indica diferencias significativas entre ambos fármacos.



VII.5.2 Efecto de Etanidazol sobre el número de células infectadas

Después de realizado el conteo de células infectadas, se pudo observar que no existió una disminución en el número de células infectadas en ninguna concentración del fármaco, lo cual fue corroborado con la prueba t pareada (Figura 20).

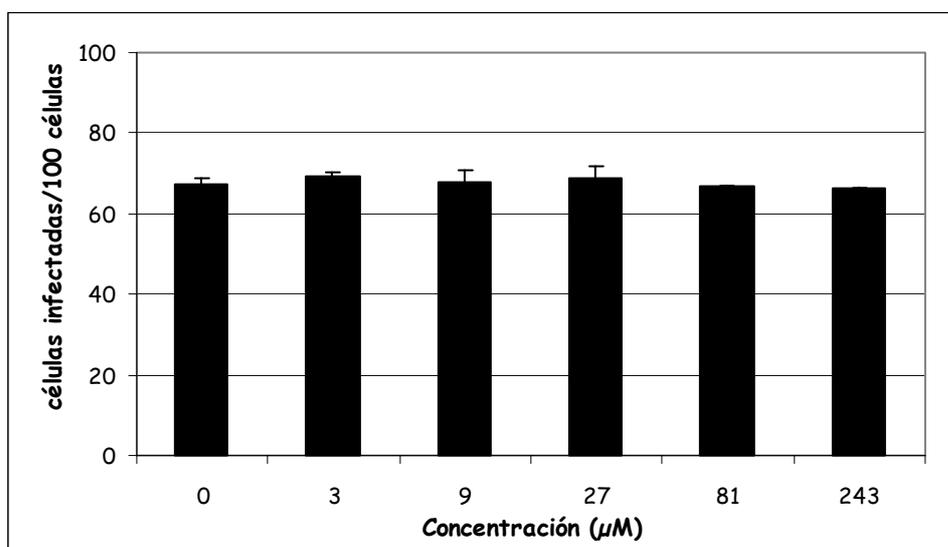


Figura 20. Efecto del Etanidazol sobre el número de células infectadas con amastigotes de la cepa Querétaro. Macrófagos (J774) fueron infectados con tripomastigotes de la cepa Querétaro en una relación 1:10 durante 24 horas en una laminilla de 18 pozos. Se removieron los parásitos extracelulares y se incubaron los macrófagos infectados con las siguientes concentraciones de Etanidazol: 3 µM, 9 µM, 27 µM, 81 µM y 243 µM, por 72 horas. Se realizó una tinción con Giemsa de la laminilla y se determinó el número de células infectadas/100 células en un microscopio óptico (100x) Microstar IV.

VII.5.3 Efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre la actividad Anti-amastigote

Se realizó el conteo de amastigotes por cada 100 células después de 72 horas de aplicado el tratamiento correspondiente y se determinó el porcentaje de actividad Anti-amastigote (%AA) como se indicó en la sección de Materiales y Métodos. Se observó una disminución en el número de amastigotes (Figura 21 y Figura 22) y por ende un aumento en el porcentaje de actividad Anti-amastigote (%AA) a medida que aumentó la concentración de los fármacos. De acuerdo a la prueba t pareada se



determinó que existía diferencia significativa entre el porcentaje de actividad Anti-amastigote sin tratamiento (control) y el porcentaje de actividad Anti-amastigote enfrentado a todas las concentraciones de ambos fármacos. Además, se realizó una comparación entre el porcentaje de actividad Anti-amastigote correspondiente a ambos tratamientos para corroborar si existen diferencias entre ambos tratamientos. La prueba t – student demostró diferencias a la concentración 2.7 μM (Figura 23).

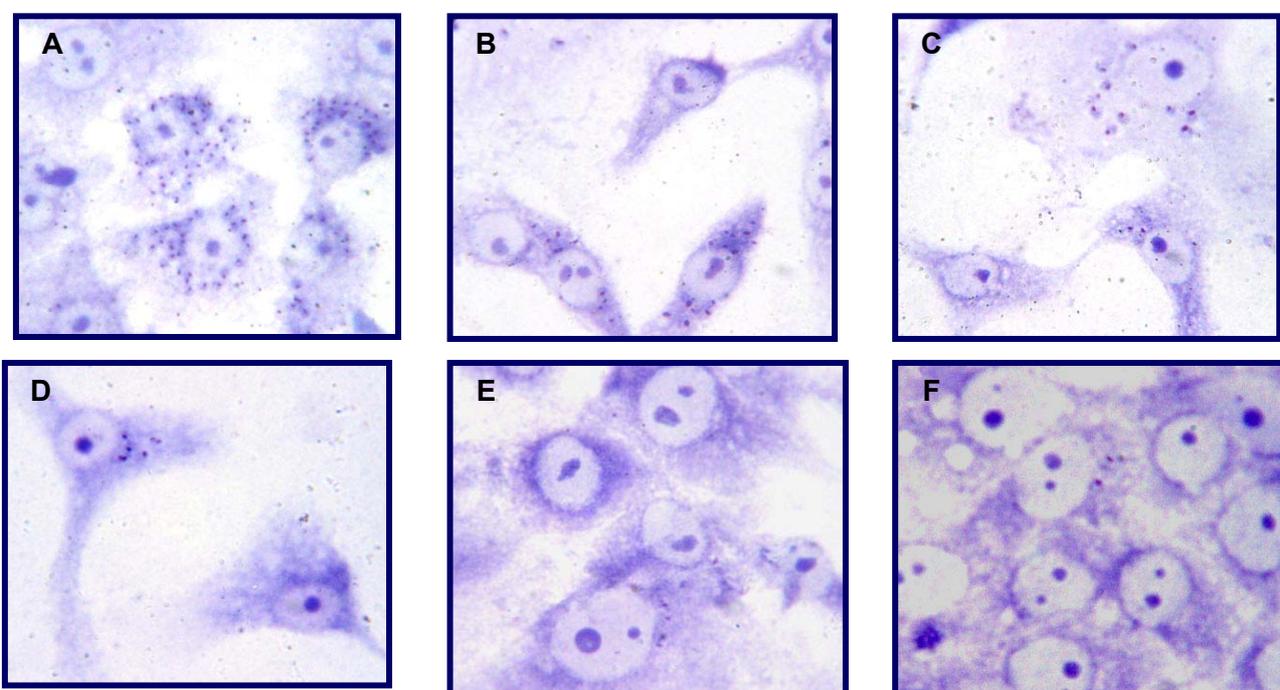


Figura 21. Efecto del Nifurtimox sobre el número de amastigotes intracelulares de la cepa Querétaro. Las laminillas fueron teñidas con Giemsa y observadas al microscopio óptico (100x). Se puede observar una disminución en el número de amastigotes presentes en las células a medida que aumenta la concentración del fármaco. (A) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* sin tratamiento. (B) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Nifurtimox 0.3 μM durante 72 horas. (C) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Nifurtimox 0.9 μM durante 72 horas. (D) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Nifurtimox 2.7 μM durante 72 horas. (E) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Nifurtimox 8.1 μM durante 72 horas. (F) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Nifurtimox 24.3 μM durante 72 horas.

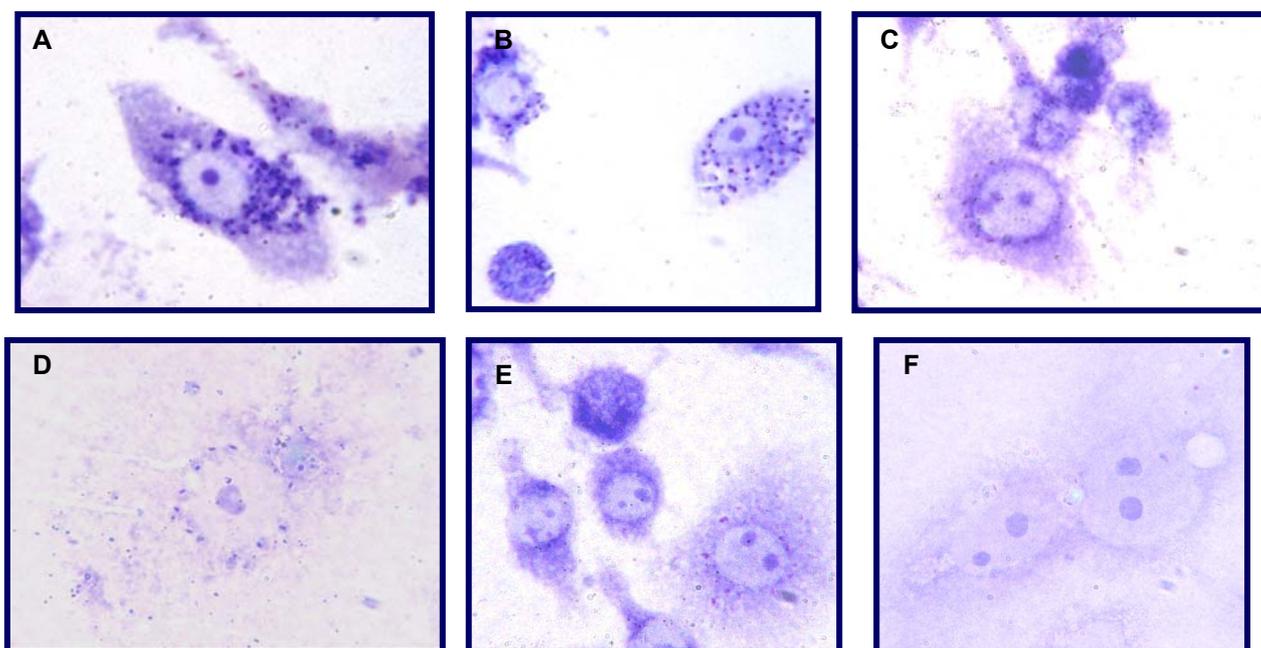


Figura 22. Efecto del Benznidazol sobre el número de amastigotes intracelulares de la cepa Querétaro. Las laminillas fueron teñidas con Giemsa y observadas al microscopio óptico (100x). Se puede observar una disminución en el número de amastigotes presentes en las células a medida que aumenta la concentración del fármaco. (A) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* sin tratamiento. (B) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Benznidazol 0.3 μM durante 72 horas. (C) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Benznidazol 0.9 μM durante 72 horas. (D) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Benznidazol 2.7 μM durante 72 horas. (E) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Benznidazol 8.1 μM durante 72 horas. (F) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Benznidazol 24.3 μM durante 72 horas

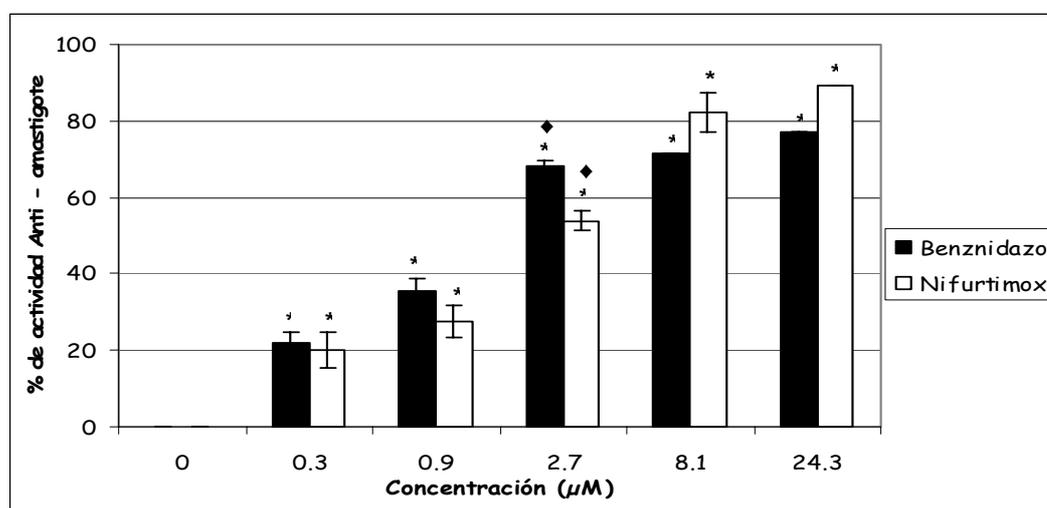


Figura 23. Efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre el porcentaje de actividad Anti - amastigote de la cepa Querétaro. Macrófagos (J774) fueron infectados con tripomastigotes de la cepa Querétaro en una relación 1:10 durante 24 horas en una laminilla de 18 pozos. Se removieron los parásitos extracelulares y se incubaron los macrófagos infectados con las siguientes concentraciones de Benznidazol y Nifurtimox: 0.3 μM , 0.9 μM , 2.7 μM , 8.1 μM y 24.3 μM , por 72 horas. Se realizó una tinción con Giemsa de la laminilla y se determinó el número de células infectadas/100 células en un microscopio óptico (100x) Microstar IV. La obtención del %AA se indica en la sección de Materiales y Métodos El asterisco (*) muestra las concentraciones a las cuales se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de parásitos vivos enfrentados a la concentración correspondiente y el porcentaje de parásitos del control (sin tratamiento). El símbolo (♦) indica diferencias significativas entre ambos fármacos.



VII.5.4 Efecto del Etanidazol sobre la actividad Anti-amastigote

Después de realizado el conteo de amastigotes se obtuvo el porcentaje de actividad Anti-amastigote. No se observó una disminución notoria en el número de amastigotes dentro de las células, pues pudieron observarse infectadas las células aún en la concentración más alta del fármaco (Figura 24). De acuerdo a la prueba t pareada se determinó que no existían diferencias significativas entre el porcentaje de actividad Anti-amastigote sin tratamiento y el porcentaje de actividad Anti-amastigote enfrentado a las cinco concentraciones del fármaco (Figura 25).

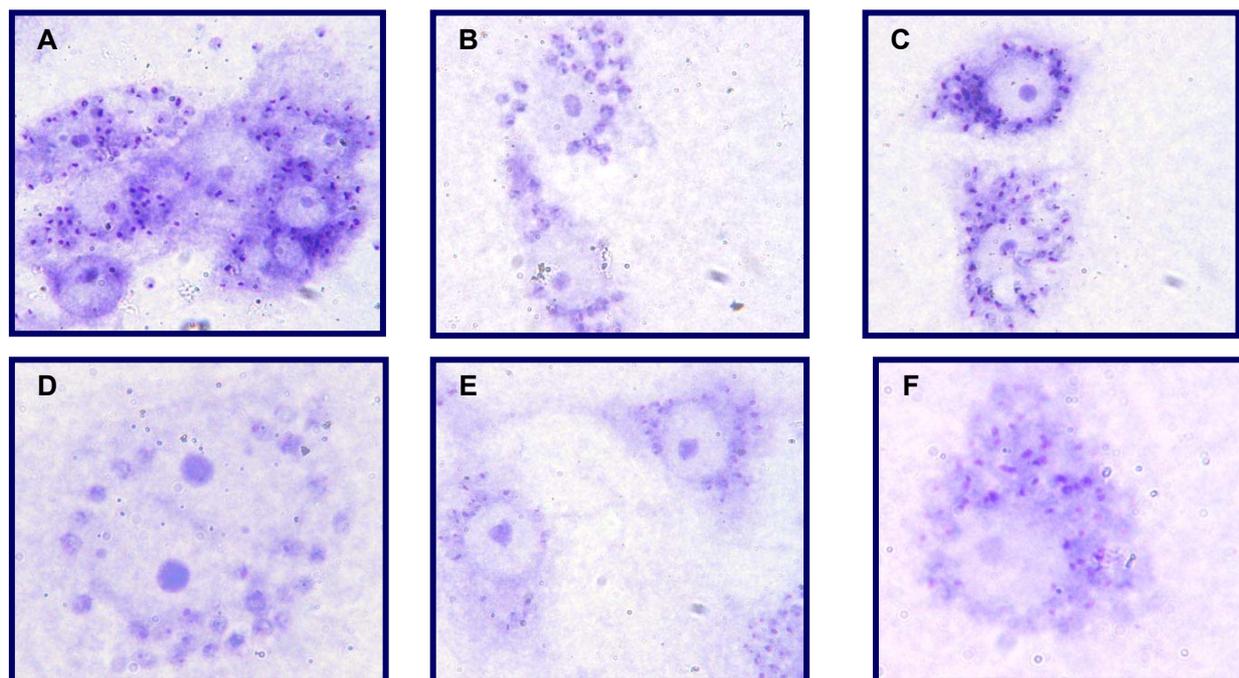


Figura 24. Efecto del Etanidazol sobre el número de amastigotes intracelulares de la cepa Querétaro. Las laminillas fueron teñidas con Giemsa y observadas al microscopio óptico (100x). No se observó una disminución en el número de amastigotes presentes en las células a medida que aumenta la concentración del fármaco. (A) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* sin tratamiento. (B) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Etanidazol 3 μM durante 72 horas. (C) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Etanidazol 9 μM durante 72 horas. (D) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Etanidazol 27 μM durante 72 horas. (E) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Etanidazol 81 μM durante 72 horas. (F) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Etanidazol 243 μM durante 72 horas

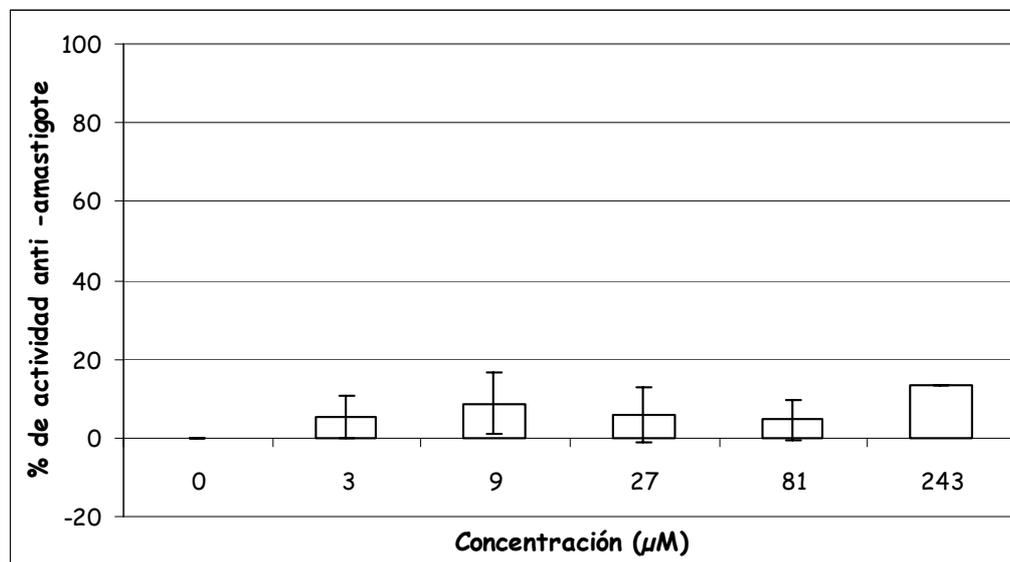


Figura 25. Efecto del Etanidazol sobre el porcentaje de actividad Anti-amastigote de la cepa Querétaro. Macrófagos (J774) fueron infectados con tripomastigotes de la cepa Querétaro en una relación 1:10 durante 24 horas en una laminilla de 18 pozos. Se removieron los parásitos extracelulares y se incubaron los macrófagos infectados con las siguientes concentraciones de Etanidazol: 3 µM, 9 µM, 27 µM, 81 µM y 243 µM, por 72 horas. Se realizó una tinción con Giemsa de la laminilla y se determinó el número de células infectadas/100 células en un microscopio óptico (100x) Microstar IV. La obtención del %AA se indica en la sección de Materiales y Métodos.

VII.6 Efecto de fármacos sobre amastigotes intracelulares de la cepa Ninoa

VII.6.1 Efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre el número de células infectadas

Se realizó el conteo de células infectadas por cada 100 células después de 72 horas de aplicado el tratamiento correspondiente. Se observó una disminución más evidente que en el caso de la cepa Querétaro en el número de células infectadas a medida que aumentó la concentración de los fármacos. De acuerdo a la prueba t pareada se determinó que existían diferencias significativas entre el número de células infectadas sin tratamiento y el número de células infectadas enfrentadas a todas las concentraciones de los fármacos para ambos tratamientos. Además se realizó la comparación correspondiente entre ambos tratamientos para corroborar si existían diferencias entre éstos, se pudo observar que no existió una mayor sensibilidad a



alguno de los fármacos y de acuerdo a la prueba t – student no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos (Figura 26).

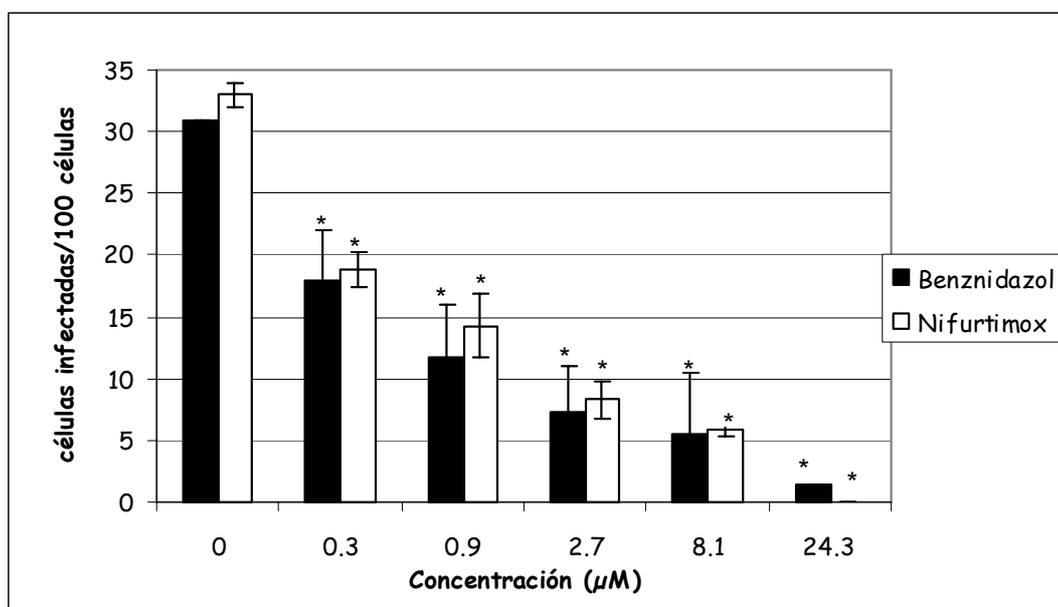


Figura 26. Efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre el número de células infectadas con amastigotes de la cepa Ninoa. Macrófagos (J774) fueron infectados con tripomastigotes de la cepa Ninoa en una relación 1:10 durante 24 horas en una laminilla de 18 pozos. Se removieron los parásitos extracelulares y se incubaron los macrófagos infectados con las siguientes concentraciones de Benznidazol y Nifurtimox: 0.3 μM, 0.9 μM, 2.7 μM, 8.1 μM y 24.3 μM, por 72 horas. Se realizó una tinción con Giemsa de la laminilla y se determinó el número de células infectadas/100 células en un microscopio óptico (100x) Microstar IV. El asterisco (*) muestra las concentraciones a las cuales se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de parásitos vivos enfrentados a la concentración correspondiente y el porcentaje de parásitos del control (sin tratamiento).

VII.6.2 Efecto del Etanidazol sobre el número de células infectadas

Después de realizado el conteo de células infectadas/100 células no se observó una disminución del número de células infectadas a medida que aumentó la concentración del fármaco. De acuerdo a la prueba t pareada se determinó que el Etanidazol no presentó actividad sobre el número de células infectadas (Figura 27).

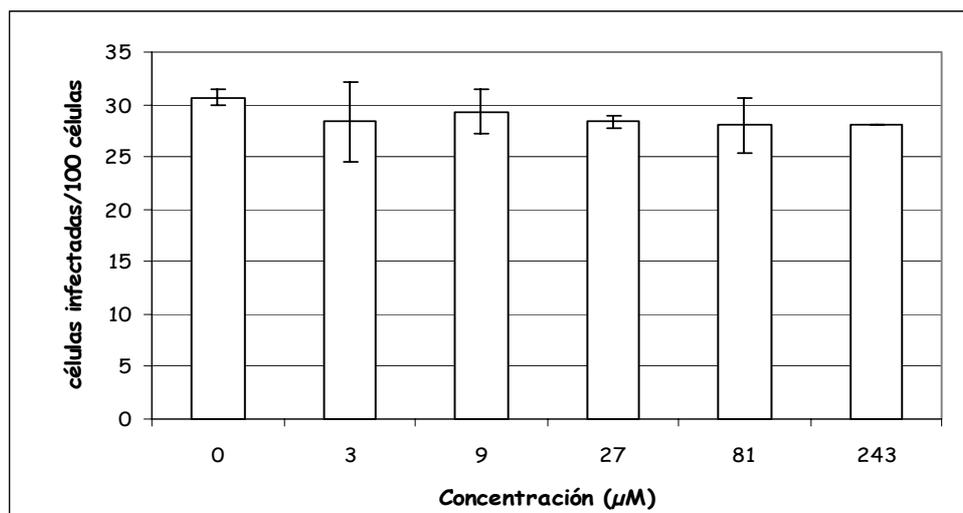


Figura 27. Efecto del Etanidazol sobre el número de células infectadas con amastigotes de la cepa Ninoa. Macrófagos (J774) fueron infectados con tripomastigotes de la cepa Ninoa en una relación 1:10 durante 24 horas en una laminilla de 18 pozos. Se removieron los parásitos extracelulares y se incubaron los macrófagos infectados con las siguientes concentraciones de Etanidazol: 3 µM, 9 µM, 27 µM, 81 µM y 243 µM, por 72 horas. Se realizó una tinción con Giemsa de la laminilla y se determinó el número de células infectadas/100 células en un microscopio óptico (100x) Microstar IV.

VII.6.3 Efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre la actividad Anti-amastigote

Se realizó el conteo de amastigotes por cada 100 células después de 72 horas de aplicado el tratamiento correspondiente y se determinó el porcentaje de actividad Anti - amastigote como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Se observó una disminución en el número de amastigotes cuando las células infectadas se observaron al microscopio pues a medida que aumentó la concentración de los fármacos la infección de las células fue disminuyendo (Figura 28 y Figura 29). En consecuencia existió aumento en el porcentaje de actividad Anti-amastigote a medida que aumentó la concentración de los fármacos. En base a la prueba t pareada se determinó que existieron diferencias significativas entre el porcentaje de actividad Anti-amastigote sin tratamiento (control) y el porcentaje de actividad Anti-amastigote enfrentado a todas las concentraciones de ambos fármacos, lo cual indica, que el fármaco presentó un efecto sobre el parásito el cual fue observado en la disminución



del número de de amastigotes intracelulares. Se realizó también una comparación entre el porcentaje de actividad Anti-amastigote correspondiente a ambos tratamientos para corroborar si existían diferencias significativas entre ambos. De acuerdo a la prueba t–student, no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos lo cual indicó que ambos fármacos presentaron el mismo efecto sobre los amastigotes de la cepa Ninoa. (Figura 30).

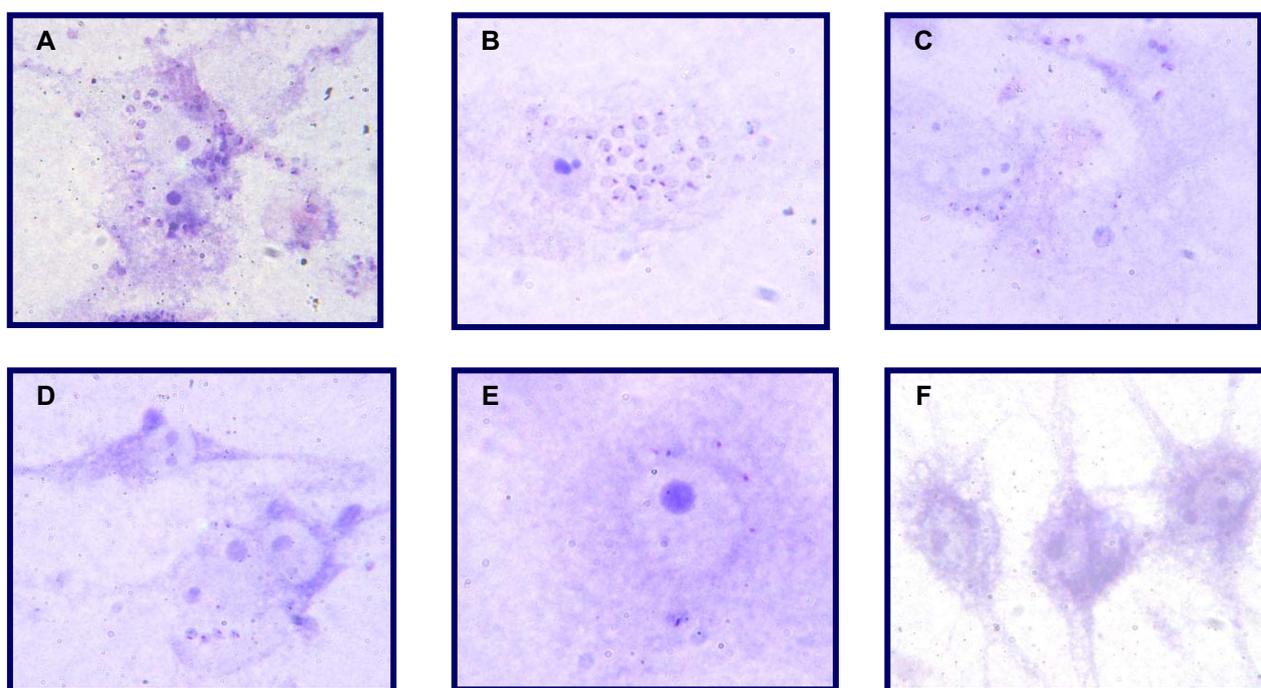


Figura 28. Efecto del Nifurtimox sobre el número de amastigotes intracelulares de la cepa Ninoa. Las laminillas fueron teñidas con Giemsa y observadas al microscopio óptico (100x). Se puede observar una disminución en el número de amastigotes presentes en las células a medida que aumenta la concentración del fármaco. (A) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* sin tratamiento. (B) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Nifurtimox 0.3 μM durante 72 horas. (C) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Nifurtimox 0.9 μM durante 72 horas. (D) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Nifurtimox 2.7 μM durante 72 horas. (E) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Nifurtimox 8.1 μM durante 72 horas. (F) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Nifurtimox 24.3 μM durante 72 horas.

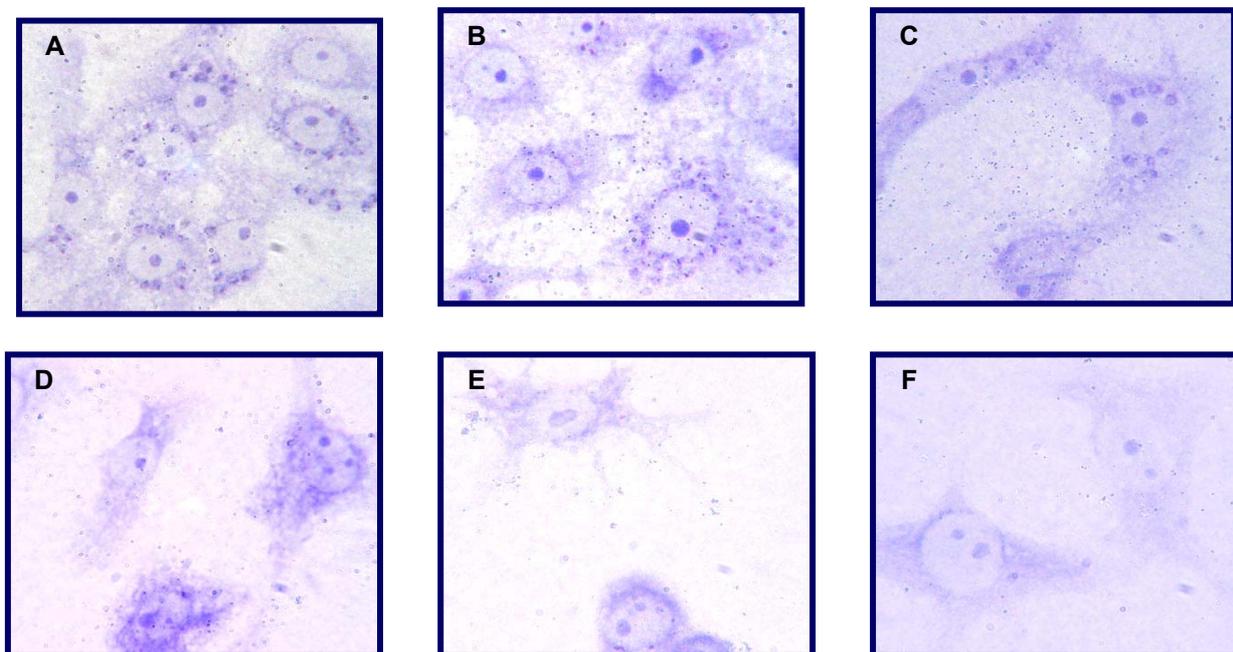


Figura 29. Efecto del Benznidazol sobre el número de amastigotes intracelulares de la cepa Ninoa. Las laminillas fueron teñidas con Giemsa y observadas al microscopio óptico (100x). Se puede observar una disminución en el número de amastigotes presentes en las células a medida que aumenta la concentración del fármaco. (A) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* sin tratamiento. (B) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Benznidazol 0.3 μM durante 72 horas. (C) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Benznidazol 0.9 μM durante 72 horas. (D) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Benznidazol 2.7 μM durante 72 horas. (E) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Benznidazol 8.1 μM durante 72 horas. (F) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Benznidazol 24.3 μM durante 72 horas.

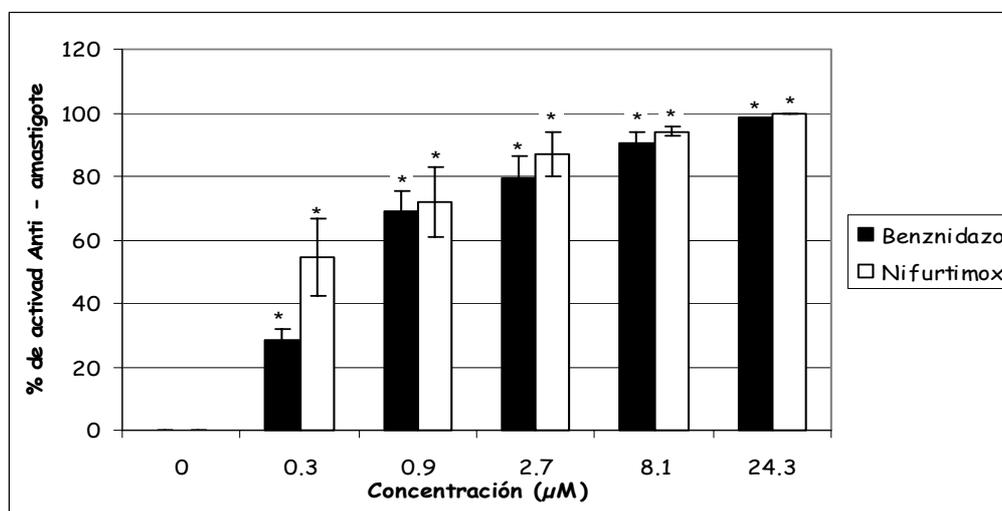


Figura 30. Efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre el porcentaje de actividad Anti-amastigote de la cepa Ninoa. Macrófagos (J774) fueron infectados con tripomastigotes de la cepa Ninoa en una relación 1:10 durante 24 horas en una laminilla de 18 pozos. Se removieron los parásitos extracelulares y se incubaron los macrófagos infectados con las siguientes concentraciones de Benznidazol y Nifurtimox: 0.3 μM , 0.9 μM , 2.7 μM , 8.1 μM y 24.3 μM , por 72 horas. Se realizó una tinción con Giemsa de la laminilla y se determinó el número de células infectadas/100 células en un microscopio óptico (100x) Microstar IV. La obtención del %AA se indica en la sección de Materiales y Métodos El asterisco (*) muestra las concentraciones a las cuales se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de parásitos vivos enfrentados a la concentración correspondiente y el porcentaje de parásitos del control (sin tratamiento).



VII.6.4 Efecto del Etanidazol sobre la actividad Anti-amastigote

Al realizar el conteo de amastigotes por cada 100 células, no se observó una disminución en el número de éstos a medida que aumenta la concentración del Etanidazol, ya que la infección dentro de las células se mantuvo constante (Figura 31). Se obtuvo también el porcentaje de actividad Anti-amastigote y de acuerdo a la prueba t pareada no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de actividad Anti-amastigote de las células sin tratamiento y el porcentaje de actividad Anti-amastigote e las células tratadas, por lo que se determinó que el Etanidazol no presentó actividad contra los amastigotes intracelulares de la cepa Ninoa (Figura 32).

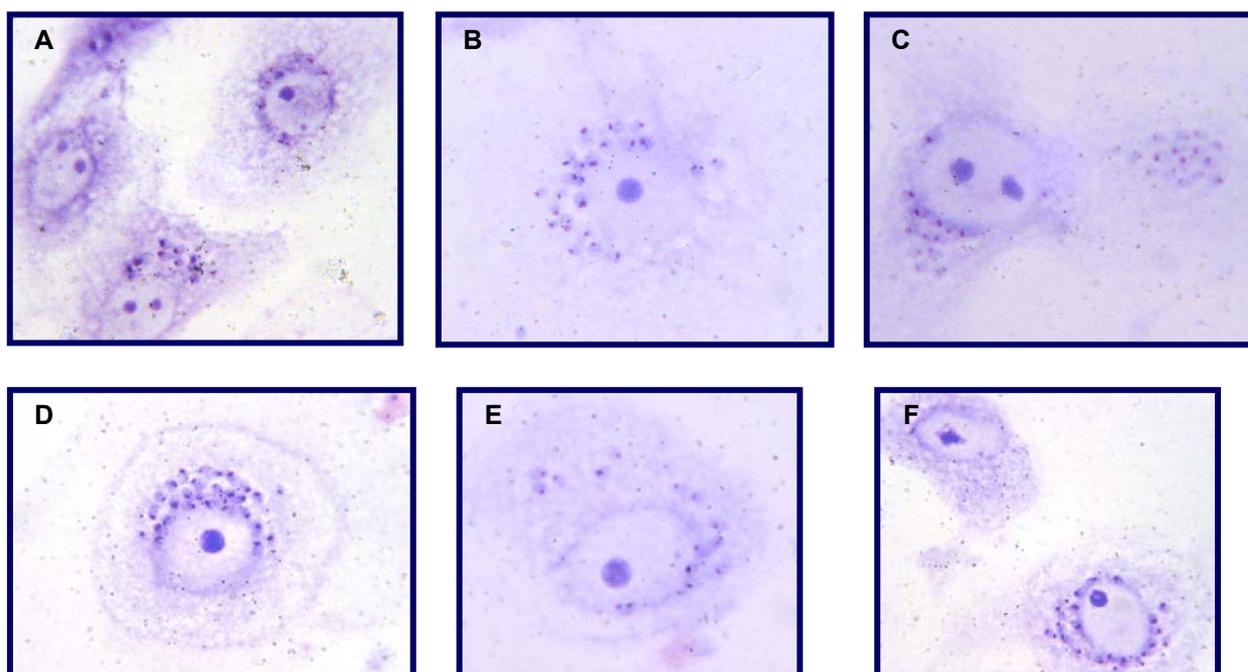


Figura 31. Efecto del Etanidazol sobre el número de amastigotes intracelulares de la cepa Ninoa. Las laminillas fueron teñidas con Giemsa. No se observó una disminución en el número de amastigotes presentes en las células a medida que aumenta la concentración del fármaco. (A) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* sin tratamiento. (B) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Etanidazol 3 μM durante 72 horas. (C) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Etanidazol 9 μM durante 72 horas. (D) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Etanidazol 27 μM durante 72 horas. (E) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Etanidazol 81 μM durante 72 horas. (F) Células J 774 infectadas con *T. cruzi* tratados con Etanidazol 243 μM durante 72 horas.

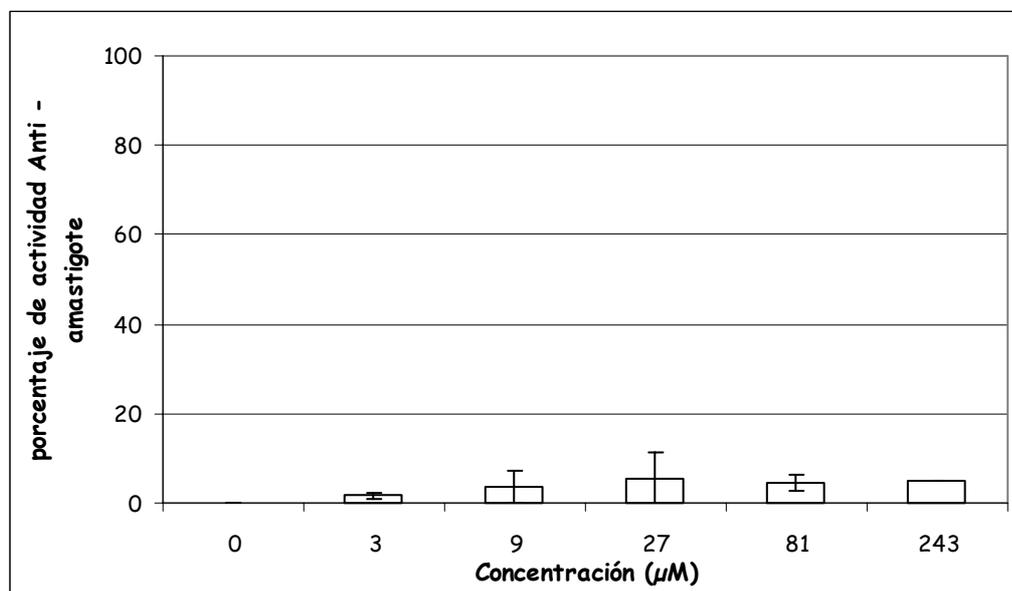


Figura 32. . Efecto del Etanidazol sobre el porcentaje de actividad Anti-amastigote de la cepa Ninoa. Macrófagos (J774) fueron infectados con tripomastigotes de la cepa Ninoa en una relación 1:10 durante 24 horas en una laminilla de 18 pozos. Se removieron los parásitos extracelulares y se incubaron los macrófagos infectados con las siguientes concentraciones de Etanidazol: 3 µM, 9 µM, 27 µM, 81 µM y 243 µM, por 72 horas. Se realizó una tinción con Giemsa de la laminilla y se determinó el número de células infectadas/100 células en un microscopio óptico (100x) Microstar IV.

VII.7 Determinación de CI_{50} para amastigotes intracelulares de las cepas Ninoa y Querétaro

La determinación de la CI_{50} , definida como la concentración requerida para alcanzar el 50% de la inhibición del crecimiento intracelular de amastigotes, fue realizada en base a los resultados obtenidos del porcentaje de actividad Anti - amastigote para cada uno de los tratamientos mediante el Método Probit (Anexo F). No fue posible realizar la determinación para el tratamiento con Etanidazol ya que no existió un efecto de este fármaco sobre los amastigotes intracelulares de las cepas mexicanas estudiadas. En cambio cuando se evaluaron el Nifurtimox y Benznidazol, se encontraron concentraciones menores de CI_{50} para inhibir el crecimiento de la cepa Ninoa que para la cepa Querétaro, lo que indicó que la cepa Ninoa fue más sensible a la acción del Benznidazol y Nifurtimox que la cepa Querétaro (Tabla 2).



Tabla 2. Valores de CI_{50} para Benznidazol y Nifurtimox para inhibir el crecimiento de amastigotes intracelulares	
Efecto sobre amastigotes de la cepa Querétaro	
Tratamiento	CI_{50} (μM)
Benznidazol	1.82
Nifurtimox	2.00
Efecto sobre amastigotes de la cepa Ninoa	
Tratamiento	CI_{50} (μM)
Benznidazol	0.60
Nifurtimox	0.27

Valores de CI_{50} correspondientes al efecto de los fármacos sobre amastigotes intracelulares. Los valores fueron determinados por el método Probit.

VII.8 Comparación del efecto de fármacos sobre amastigotes intracelulares de las cepas Ninoa y Querétaro

Se realizó una comparación del efecto de los fármacos sobre amastigotes de ambas cepas con la finalidad de corroborar si existían diferencias en las respuestas de éstas a los tratamientos. La comparación sólo se llevó a cabo tomando en cuenta el porcentaje de actividad Anti-amastigote, ya que el número de células infectadas fue distinta para cada cepa dada su diferencia en cuanto a virulencia. Se observó una mayor sensibilidad de la cepa Ninoa a los tratamientos con Benznidazol y Nifurtimox, ya que el porcentaje de actividad Anti-amastigote fue mayor para ésta que para la cepa Querétaro. De acuerdo a la prueba t student se determinó que existían diferencias significativas entre ambas cepas a las concentraciones 0.3 μM , 0.9 μM , 2.7 μM , 8.1 μM y 24.3 μM respecto al tratamiento con Benznidazol y a las concentraciones 0.3 μM , 0.9 μM y 2.7 μM respecto a Nifurtimox. Respecto al tratamiento con el Etanidazol no se observó un efecto sobre ninguna de las cepas (Figura 33).

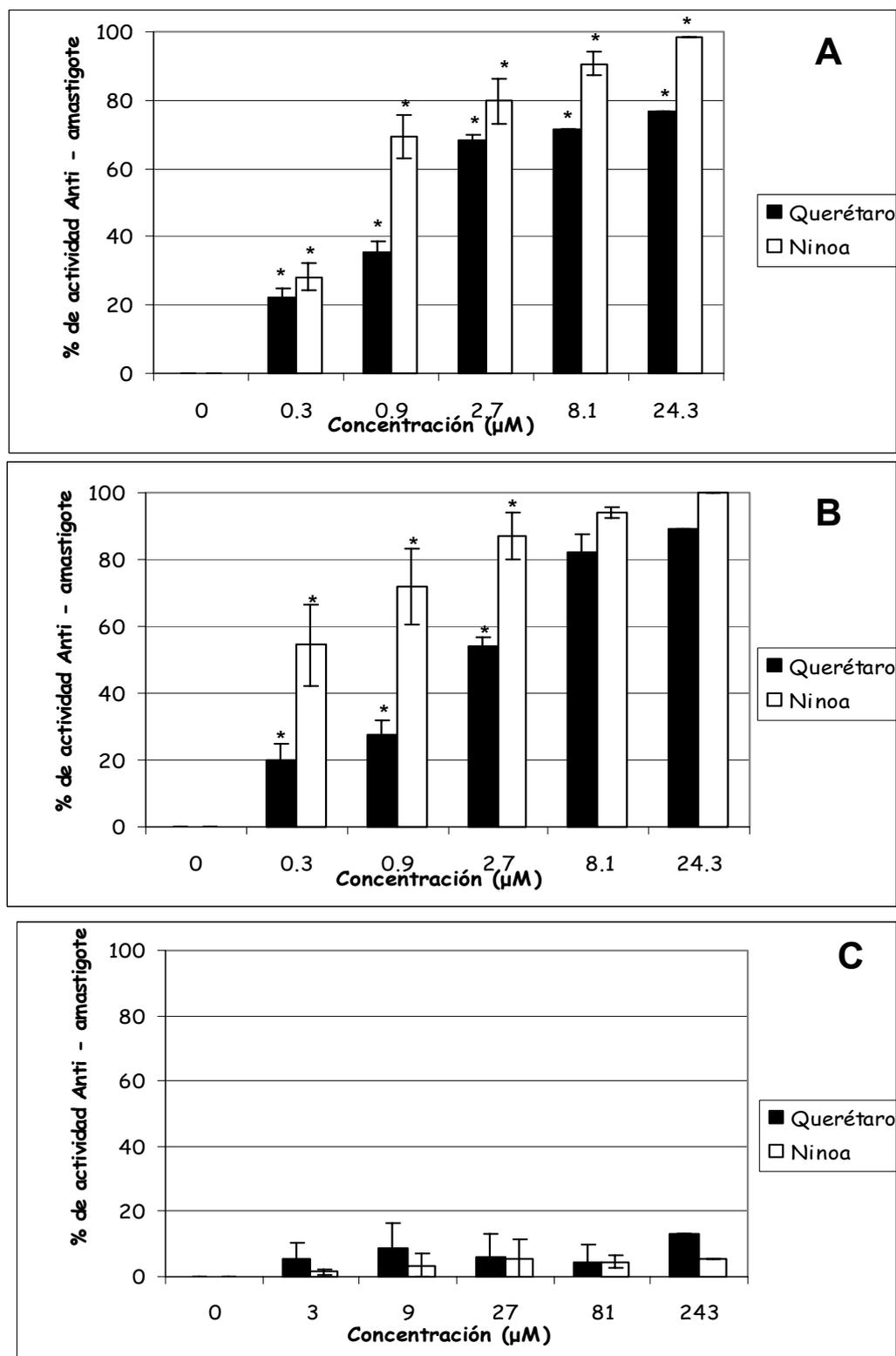


Figura 33. Comparación de la relación dosis – respuesta reflejada en el aumento de la actividad Anti-amastigote entre las cepas Querétaro y Ninoa. Los tratamientos correspondientes son los siguientes: **(A)** Benznidazol, **(B)** Nifurtimox y **(C)** Etanidazol. El asterisco (*) muestra las concentraciones a las cuales se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de actividad Anti-amastigote de la cepa Ninoa y el porcentaje de parásitos de la cepa Querétaro.



VIII. DISCUSIÓN

El tratamiento de la Enfermedad de Chagas se encuentra limitado al empleo de dos compuestos (Benznidazol y Nifurtimox) que resultan ser poco efectivos dada su limitada acción en la fase crónica de la enfermedad y los numerosos efectos adversos que se presentan durante su aplicación en pacientes. Por tales razones estos tratamientos deben ser mejorados, por lo que la búsqueda de una nueva estrategia terapéutica es necesaria. El Etanidazol, además de ser un compuesto menos tóxico, resultó ser muy efectivo contra tripomastigotes y amastigotes intracelulares de la cepa sudamericana RA. Además, en ese trabajo se mencionaba que era necesaria la evaluación de la actividad de este compuesto contra otras cepas de *T. cruzi* (Petray et al., 2004) debido a las diferencias de susceptibilidad a fármacos que existen entre ellas (Filardi y Brener, 1987). Lo anterior aunado a la limitada evaluación de la actividad de distintos compuestos contra cepas mexicanas de *T. cruzi* marca la relevancia de este trabajo.

En el presente trabajo se estudió el efecto del Etanidazol sobre los estadios tripomastigote y amastigote de las cepas mexicanas Ninoa y Querétaro de *T. cruzi*. Ambos estadios se encuentran presentes en el hospedero, el primero es considerado la fase infectiva del parásito y el segundo es la fase intracelular replicativa. La utilización de estos estadios del parásito es importante ya que contrasta con la mayoría de los estudios de la actividad de fármacos contra *T. cruzi*, los cuales se enfocan a la evaluación de la actividad contra epimastigotes, que es el estadio no infectivo presente solamente en el vector hematófago (Sánchez et al., 2005; Jorqueira et al., 2006). Además en algunos estudios se han demostrado diferencias de susceptibilidad a fármacos entre el estadio tripomastigote y epimastigote (Menna – Barreto et al., 2005; del Olmo et al., 2001), lo cual podría deberse a diferencias que llegan a presentar respecto a las concentraciones de tioles libres entre ellos (Maya et



al., 1997). Esto hace que la determinación de la actividad del Etanidazol sobre tripomastigotes y amastigotes sea más relevante para poder considerar a este fármaco como alternativa para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

En el caso del estudio realizado con tripomastigotes se utilizaron tripomastigotes sanguíneos como se ha reportado en otros trabajos (del Olmo et al., 2001; Ribeiro et al., 1997; Campos et al., 2004; Oliveira et al., 2003; Mafezoli et al., 2000). Tanto en la cepa Querétaro como en la cepa Ninoa, se observó una relación dosis – respuesta respecto a los tratamientos con Benznidazol y Nifurtimox. A pesar de que los parásitos no se tiñeron con el azul tripano (colorante vital que se incorpora a la membrana de los parásitos cuando están muertos), se observó una disminución en el número de éstos a medida que aumentó la concentración de los fármacos. En la cepa Querétaro a partir de la concentración $4.4 \mu\text{M}$ y en la cepa Ninoa a partir de la concentración $1.48 \mu\text{M}$, se pudo considerar que ambos fármacos presentaron un efecto sobre el porcentaje de parásitos vivos, y en ambos casos, se llegó a la eliminación del parásito a partir de la concentración $40 \mu\text{M}$ a las 48 horas de exposición, lo cual coincide con lo reportado para la cepa RA (Petray et al., 2004).

De acuerdo a los valores obtenidos para DL_{50} , éstos fueron siempre menores para el tratamiento con Nifurtimox y menores además para la cepa Ninoa (Cepa Querétaro DL_{50} Benznidazol: $19.8 \mu\text{M}$, DL_{50} Nifurtimox: $12.98 \mu\text{M}$, Cepa Ninoa DL_{50} Benznidazol: $6.59 \mu\text{M}$, DL_{50} Nifurtimox: $4.63 \mu\text{M}$). Sin embargo, de acuerdo al análisis estadístico, no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos, lo que indicó que ambos tratamientos se comportaron de la misma manera al disminuir el número de parásitos. En cuanto a la comparación entre cepas, se pudo observar que los valores de la DL_{50} correspondientes a la cepa Ninoa fueron mucho menores que en el caso de la cepa Querétaro. De acuerdo al análisis estadístico, encontramos diferencias entre el porcentaje de parásitos vivos de ambas cepas a la concentración $40 \mu\text{M}$ en el caso de



Benznidazol y a las concentraciones 13.3 μM y 40 μM en el caso del tratamiento con Nifurtimox. Estas diferencias estadísticas en conjunto con los valores de DL_{50} obtenidas en el caso de los tripomastigotes de cepa Ninoa podrían indicarnos que esta última es más susceptible al tratamiento con Benznidazol y Nifurtimox. Respecto a la cepa RA, el valor de DL_{50} Benznidazol: 6.6 μM resultó ser menor en comparación con la cepa Querétaro y prácticamente igual con la cepa Ninoa, lo cual indicó que las cepas RA y Ninoa son más sensibles al efecto del Benznidazol que la cepa Querétaro (Petray et al., 2004).

Respecto a los efectos sobre el porcentaje de movilidad (sólo realizado para la cepa Querétaro ya que para la cepa Ninoa todos los parásitos observados eran móviles), se observó que el Benznidazol presentó un efecto sobre la movilidad del parásitos a partir de la concentración 40 μM cuando el tratamiento fue aplicado durante 24 horas, mientras que a las 48 horas se observó una disminución en la movilidad de los parásitos a partir de la concentración 13.3 μM . En cuanto al tratamiento con Nifurtimox se observó un efecto sobre el porcentaje de movilidad de los parásitos a partir de la concentración 13.3 μM tanto a las 24 como a las 48 horas. De acuerdo a lo anterior, el Nifurtimox presentó un mayor efecto sobre la movilidad de los parásitos, lo cual se reflejó en la disminución de la movilidad de éstos desde las 24 horas a una concentración más baja que la necesaria para producir el mismo efecto con Benznidazol. La diferencia de sensibilidad a fármacos reflejada en la disminución de la movilidad corresponde a lo descrito previamente (Martínez, 2006) en donde se encontró que epimastigotes de la cepa Querétaro resultaron ser más sensibles a la acción del Nifurtimox que al Benznidazol. En este estudio también se describió que la movilidad de epimastigotes de la cepa Ninoa no es sensible al efecto de los fármacos, lo cual corresponde con lo que se encontró en tripomastigotes.



Se observaron también modificaciones en la morfología de los parásitos de la cepa Querétaro, sugiriendo que los fármacos provocan cambios morfológicos reflejados principalmente en aumento del tamaño general del parásito y presencia de vacuolas. Esto ya ha sido observado con otros fármacos como el caso del estudio realizado por Paglini–Oliva et al., 1998, en el que se observaron alteraciones estructurales principalmente a nivel de citoplasma y organelos en tripomastigotes y epimastigotes de la cepa Tulahuen tratados con tioridazina. En el caso del Nifurtimox y Benznidazol se observó un aumento en el porcentaje de parásitos con morfología anormal a medida que aumentó la concentración del fármaco y el tiempo de exposición a éste. Lo anterior contrasta con el efecto del Etanidazol sobre la morfología de los parásitos, pues prácticamente no se observaron parásitos con morfología anormal a las 24 horas y aunque a las 48 horas comenzaron a observarse el porcentaje nunca es mayor al 40%.

El efecto del Etanidazol sobre el porcentaje de parásitos vivos y el porcentaje de movilidad de los parásitos no fue tan evidente como en el caso de los efectos de Nifurtimox y Benznidazol. Estadísticamente sólo se observaron diferencias significativas en la cepa Ninoa hasta la concentración 1200 μM a las 24 horas, lo cual indicó que el Etanidazol fue capaz de disminuir el número de parásitos vivos de la cepa Ninoa sólo a esta concentración del fármaco. Es importante mencionar que en ninguna cepa se vio disminuido el porcentaje de parásitos hasta un 0%. Lo anterior contrasta con el estudio realizado con la cepa RA en la cual se observó un efecto del Etanidazol sobre el porcentaje de parásitos vivos llegando al 0% de parásitos a la concentración 1200 μM a las 48 horas de exposición (Petray et al., 2004). El efecto sobre el porcentaje de movilidad para la cepa Querétaro fue nulo.

Respecto al estudio realizado sobre amastigotes contenidos en macrófagos para ambas cepas se observó una relación dosis – respuesta en los tratamientos con



Benznidazol y Nifurtimox, pero no se observó un efecto en el caso del tratamiento con Etanidazol. En el caso de la cepa Querétaro, se observó un efecto sobre el número de células infectadas a partir de la concentración $0.9 \mu\text{M}$ y, respecto al porcentaje de actividad Anti-amastigote, el efecto se observó desde la concentración $0.3 \mu\text{M}$ para ambos tratamientos, mientras que para la cepa Ninoa, la disminución del número de células infectadas y del porcentaje de actividad Anti-amastigote ocurrió desde la concentración $0.3 \mu\text{M}$. Esto indicó que en el caso de la cepa Querétaro, a medida que aumenta la concentración del fármaco, disminuyó el número de amastigotes; sin embargo, el número de células infectadas fue más difícil que disminuyera en comparación con la cepa Ninoa. Lo anterior posiblemente se relacione con las diferencias observadas en relación a su infectividad in vitro, pues la cepa Querétaro es más virulenta que la cepa Ninoa y el número de amastigotes dentro de la célula infectada resulta ser mayor para la primera cepa que para la segunda (Jiménez, 2005). La relación dosis respuesta observada para las cepas Ninoa y Querétaro resultó ser diferente a los efectos observados en otros trabajos en donde se evaluó la actividad de fármacos sobre amastigotes intracelulares. En un estudio de evaluación del efecto del Nifurtimox en la cepa Y (Muelas et al., 2002) se llegó al 92% de actividad contra los amastigotes a una concentración de $34.8 \mu\text{M}$ después de 48 horas de haber incubado a las células infectadas con el fármaco. Este porcentaje de actividad es muy similar al obtenido para la cepa Querétaro a la concentración $24.3 \mu\text{M}$, pues fue de 95%; sin embargo, el tiempo de exposición fue mayor (72 horas), lo cual coincide con el estudio realizado para la cepa RA, en donde se obtuvo cerca del 100% de actividad a la concentración $24.3 \mu\text{M}$ (Petray et al., 2004).

En relación con los valores de IC_{50} obtenidos, en el caso de la cepa Querétaro fueron muy similares aunque ligeramente menor para Benznidazol que para Nifurtimox, mientras que en el caso de la cepa Ninoa, fue menor el valor para



Nifurtimox que para Benznidazol lo cual pudo indicarnos que el Nifurtimox fue más potente que el Benznidazol para la cepa Ninoa. (Cepa Querétaro IC_{50} Benznidazol: 1.82 μ M, IC_{50} Nifurtimox: 2.00 μ M, Cepa Ninoa IC_{50} Benznidazol: 0.6 μ M, IC_{50} Nifurtimox: 0.27 μ M). Los valores de IC_{50} fueron muy diferentes para ambas cepas lo que indicó que los amastigotes de la cepa Ninoa fueron más susceptibles al tratamiento con Benznidazol y Nifurtimox que los amastigotes de la cepa Querétaro. Respecto al estudio realizado con la cepa RA el valor de IC_{50} Benznidazol: 1 μ M (Petray et al., 2004) resultó ser menor que la concentración obtenida para la cepa Querétaro y mayor que la obtenida para la cepa Ninoa. Lo anterior indica nuevamente que las cepas RA y Ninoa son más sensibles al efecto del Benznidazol que la cepa Querétaro.

En relación con el tratamiento con Etanidazol, no se observó efecto sobre el número de células infectadas, ni sobre el porcentaje de actividad Anti-amastigote, lo cual indica que el Etanidazol no presentó actividad sobre amastigotes de ninguna de las dos cepas estudiadas. Lo anterior contrasta con el estudio realizado con la cepa RA, en el cual se observó un efecto del Etanidazol sobre amastigotes de la cepa, llegando incluso a un 100% de actividad a la concentración 243 μ M a las 72 horas de exposición (Petray et al., 2004).

No se realizó algún análisis estadístico comparando los efectos de los tres tratamientos sobre los tripomastigotes de sangre de ratón infectado y los amastigotes contenidos en macrófagos, ya que las condiciones bajo las cuales se evaluó el Etanidazol (concentraciones) fueron diferentes a las empleadas en el caso de los tratamientos realizados con Benznidazol y Nifurtimox. Las concentraciones de Etanidazol empleadas fueron 10 veces mayores que las empleadas para los otros dos fármacos, esto fue debido a que en un estudio previo realizado con la cepa sudamericana RA se observó efecto de este fármaco sobre tal cepa a concentraciones 10 veces mayores que las empleadas para Benznidazol (Petray et al., 2004).



La baja actividad del Etanidazol sobre tripomastigotes y amastigotes en comparación con los efectos observados para Nifurtimox y Benznidazol, podría explicarse en base al carácter hidrofílico de la molécula. Lo anterior, origina que su difusión a través de la membrana celular tanto de la célula hospedera como del parásito sea más lenta que en el caso del Benznidazol y Nifurtimox que son moléculas de carácter hidrofóbico. Esto trae como consecuencia que su acumulación dentro de la célula blanco se alcance a velocidad más lentas y que la concentración alcanzada dentro de la célula sea mucho menor que en el caso de Benznidazol y Nifurtimox (Morilla et al. 2004), lo cual también puede explicar la decisión de utilizar concentraciones 10 veces mayores de Etanidazol y Nifurtimox para observar un efecto sobre la cepa sudamericana RA (Petray, et al., 2004).

La diferencia de susceptibilidad al Etanidazol entre la cepa sudamericana RA (Petray et al., 2004) y las cepas mexicanas Ninoa y Querétaro, nos permitieron corroborar que existe variabilidad de susceptibilidad a fármacos entre cepas de *T. cruzi*. Lo anterior podría deberse a diferencias biológicas que existen entre las distintas cepas de *T. cruzi*, que incluso podrían verse reflejadas en polimorfismos que se llegan a presentar a nivel de la enzima tripanotión sintetasa que es clave en la síntesis del tripanotión, este último necesario para proteger al parásito del estrés oxidativo (Tran et al., 2003). El estrés oxidativo es uno de los mecanismos de acción propuestos para el efecto de Benznidazol y Nifurtimox sobre los parásitos y para el Etanidazol sobre células cancerígenas.

Sólo existen dos trabajos previos sobre el efecto de formas aisladas mexicanas no caracterizadas genéticamente. Un estudio realizado por Noguera – Torres et al., 2001, en el que se reportaron diferencias de susceptibilidad entre las cepas mexicanas Ninoa y Miguz, siendo la primera sensible a Benznidazol y la última resistente; y en el estudio realizado por Chena, et al., 2005, en donde se reportan a las cepas Miguz y



Compostela como resistentes a Benznidazol y Nifurtimox, a las cepas Parra y Nayarit como ligeramente más sensibles a Benznidazol y la cepa V2R como sensible a Nifurtimox.

Finalmente, los resultados obtenidos de susceptibilidad a Nifurtimox y Benznidazol entre las cepas Ninoa y Querétaro, permitieron verificar que existe una alta heterogeneidad de susceptibilidad a fármacos entre cepas que pertenecen al mismo grupo genético I que se encuentra presente en México. Estos datos son importantes de considerar al aplicar los tratamientos a los pacientes.



IX. CONCLUSIONES

- Se observó un efecto diferencial del Nifurtimox y Benznidazol sobre tripomastigotes sanguíneos y amastigotes intracelulares de las cepas Ninoa y Querétaro, siendo la cepa Ninoa más sensible al efecto de los fármacos.
- Respecto al efecto sobre tripomastigotes sanguíneos, los efectos fueron reflejados en una disminución en el número de parásitos vivos, alteraciones morfológicas y disminución en la movilidad en la cepa Querétaro; mientras que en la cepa Ninoa sólo se observó disminución en el número de parásitos ya que la movilidad de esta cepa no se vio afectada.
- Respecto al efecto sobre amastigotes intracelulares, los efectos de Nifurtimox y Benznidazol, fueron reflejados en una disminución en el número de células infectadas y el número de amastigotes dentro de macrófagos.
- No se observó un efecto del Etanidazol sobre tripomastigotes de la cepa Querétaro; sin embargo, en la cepa Ninoa se observó un efecto reflejado en la disminución del número de parásitos sólo a la concentración 1200 μM , lo que indicó que la cepa Ninoa es más sensible al efecto por el fármaco. No se observó un efecto del fármaco sobre amastigotes contenidos en macrófagos.



X. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Dado que se observó un ligero efecto del Etanidazol sobre tripomastigotes de la cepa Ninoa, sería importante analizar el efecto de este fármaco a concentraciones mayores a las evaluadas en este trabajo, considerando, no llegar a condiciones tóxicas para el organismo. Es importante también estudiar el efecto del Etanidazol sobre otras cepas de *T. cruzi*, pues aunque no se observa un efecto significativo sobre las cepas mexicanas Querétaro y Ninoa, existe una alta variabilidad de susceptibilidad a fármacos. Aunado a lo anterior, es importante el desarrollo de más estrategias terapéuticas que permitan tener un amplio rango de posibilidades para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas, tomando en cuenta el desarrollo de terapéutica más eficaz y menos tóxica.



XI. BIBLIOGRAFÍA

- *Bosseno M.F., Barnabé C., Magallón G.E., Lozano K.F., Ramsey J., Espinoza B., Brenière S.F., (2001). Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. J. Clin. Microbiol. **40**: 627-632.
- *Brenière S.F., Bosseno M.F., Espinoza B., 1999. Genética de las poblaciones de *Trypanosoma cruzi* En: Chagas la enfermedad en Bolivia. Editado por JRA Cassab, F. Noireau y G. Guillén. OPS – OMS - IRD – IBBA: 201 – 208.
- *Campos F.R., Januário A.H., Rosas L.V., Nascimento S.K.R., Pereira P.S., França S.C., Cordeiro M.S.C., Toldo M.P.A., Albuquerque S., (2005). Trypanocidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. Fitoterapia. **76**: 26-29.
- *Cançado J.R, (1999). Criteria of Chagas disease cure. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **94**: 331-336.
- *Chena M.A., Elizondo S., Rodríguez – Páez L., Noguera B., Baeza I., Wong C., (2005). Trypanocidal activity of N – isopropyl oxamate on cultured epimastigotes and murine trypanosomiasis using different *Trypanosoma cruzi* strains. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. **20**: 189-197.
- *Coleman C.N., Halse J., Cox R.S., Hirst V.K., Blaschek T., Howes A.E., Wasserman T.H., Urtasun R.C., Pajak T., Hancock S., (1987). Relationship between the neurotoxicity of the hypoxic cell radiosensitizer SR 2508 and the pharmacokinetic profile. Cancer Res. **47**: 319-322.
- *Croft S.L., Barrett M.P., Urbina J.A., (2005). Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. Trends Parasitol. **11**: 508-512.
- *de Oliveira S.F., Pedrosa R.C., Nascimento J.H., Campos de Carvalho A.C., Masuda M.O., (1997). Sera from chronic chagasic patients with complex cardiac arrhythmias depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. Circulation. **96**: 2031-2037.



*del Olmo E., García A.M., López – Pérez J.L., Ruiz G., Vargas F., Jiménez A., Deharo E., San Feliciano A., (2001). Anti – Trypanosoma activity of some natural stilbenoids and synthetic related heterocyclic compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**: 2755-2757.

*Docampo R., y Stoppani A.O.M., (1979). Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by Nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem. Biophys.* **197**: 317-321.

*Eschwège F., Sancho – Garnier H., Chassagne D., Brisgand D., Guerra M., Malaise E.P., Bey P., Busutti L., Cionini L., N'Guyen G., Romanini A., Chavaudra J., Hill C., (1997). Results of a European randomized trial of Etanidazole combined with radiotherapy in head and neck carcinomas. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **2**: 275-281.

*Filardi L.S., and Brener Z., (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 755-759.

*Finney D.L., (1977). Probit analysis. Cambridge University Press United Kingdom: 20-39.

*García S., Ramos C.O., Senra J.F.V., Vilas – Boas F., Rodrigues M.M., Campos – de – Carvalho A.C., Ribeiro – dos – Santos R., Soares M.B.P., (2004). Treatment with Benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 1521-1528.

*Gaunt M. W., Yeo M., Frame I.A., Stothard J. R., Carrasco H. J., Trylor M.C., Solis M. S., Veazey P., Miles G.A.J., Acosta N., Rojas de Arias A., Miles M.A., (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature.* **421**: 936-939.



*Goijman S.G, y Stoppani, A.O.M., (1983). Efectos del Nifurtimox, Benznidazol y β – lapachona sobre el metabolismo del AND, ARN y proteínas en *Trypanosoma cruzi*. Rev. Argent. Microbiol: 193-204.

*Goodman G.A., Hardman J.G., Limbird L.E., (2003). Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editado por Mc Graw Hill. 10ª edición. Estados Unidos de América II: 1124-1125.

*Hernández C.C.Q., Barillos L.C., Jiménez L.E.D., Cabarcas R.A.B., García S., Pedrosa R.C., Nascimento J.H.M., Kurtenbach E., Masuda M.O., Campos de Carvalho A.C., (2003). Human chagasic IgGs bind to cardiac muscarinic receptors and impair L-type Ca^{2+} currents. Cardiovasc. Res. **58**: 55-65.

*Jiménez A., (2005). Análisis de la respuesta de macrófagos ante la infección de dos cepas de *Trypanosoma cruzi* con distinta virulencia. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM.

*Jorqueira A., Gouvea R.M., Ferreira V.F., da Silva M.N., de Souza M.C., Zuma A.A., Cavalcanti D.F., Araujo H.P., Santos D.O., Bourguignon S.C., (2006). Oxirane derivative of alpha-lapachone is potent growth inhibitor of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. Parasitology Res. **99**: 429-433.

*Lawton C.A., Coleman C.N., Buzydlowski J.W., Forman J.D., Marcial V.A., DelRowe J.D., Rotman M., (1996). Results of a phase II trial of external beam radiation with Etanidazole (SR 2508) for the treatment of locally advanced prostate cancer (RTOG Protocol 90-20). Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. **36**: 673-680.

*López M., (1999). Identificación y caracterización de epitopos protéicos de una cepa de *Trypanosoma cruzi* a través del uso de anticuerpos monoclonales. Tesis para obtener el título en Investigación Biomédica Básica. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.



- *López –Olmos V., Pérez – Nasser N., Piñero D., Ortega E., Hernández R., Espinoza B., (1997). Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **69**: 239-254.
- *Mafezoli J., Vieira P.C., Fernández J.V., da Silva M.F.G.F., de Albuquerque S., (2000). In vitro activity of *Retacea* species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacol.* **73**: 335-340.
- *Martínez M.I., (2006). Caracterización molecular de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de humano y susceptibilidad de las mismas a Nifurtimox y Benznidazol. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químico - Biológicas. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN.
- *Maya J.D., Repetto Y., Agosin M., Ojeda J.M., Tellez R., Gaule C., Morillo A., (1997). Effects of Nifurtimox and Beznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, tripomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **86**: 101-106.
- *Maya J.D., Bollo S., Nuñez – Vergara L., J., Squella J.A., Repetto Y., Morello A., Périé J., Chauvière G., (2003) *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. *Biochem. Pharmacol.* **6**: 999 – 1006.
- *Maya J.D., Cassels B., K., Iturriaga – Vásquez P., Ferreira J., Faúndez M., Galanti N., Ferreira A., Morello A., (2006). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* Article in Press Available on line 12 March 2006.
- *Menna – Baretto R.F., Henriques – Pons A., Pinto A.V., Morgado – Díaz J.A., Soares M.J., de Castro S.L., (2005). Effect of beta – lapachone – derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**: 1034-1041.



- *Morilla M.J., Montanari J., Frank F., Malchiodi E., Corral R., Petray P., Romero E.L., (2005). Etanidazole in pH – sensitive liposomes: design, characterization and in vitro/in vivo anti – *Trypanosoma cruzi* activity. J. Control Release. **103**: 599-607.
- *Muelas S., Suárez M., Pérez R., Rodríguez H., Ochoa C., Escario J.A., Gómez-Barrio A., (2002). In vitro and in vivo assays of 3,5-disubstituted-tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazin-2-thione derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **97**: 269-272.
- *Murta S.M.F., Gazzinelli R.T., Brener Z., Romanha A.J., (1998). Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to Benznidazole and Nifurtimox. Mol. Biochem. Parasitol. **93**: 203-214.
- *Nogueira – Torres B., Rodríguez – Páez L., Baeza Ramírez I., Wong Ramírez C., (2001). Trypanocidal Activity of 4 isopropyl salicylaldehyde and 4 – isopropyl salicylic acid on *Trypanosoma cruzi*. Rev. Latinoam. Microbiol:1-6.
- *Oliveira T.B., Passos A.P.F., Alves R.O., Romanha A.J., Prado M.A.F., Dias de Souza Filho J., Alves R.J., (2003). In vitro evaluation of the activity of aromatic nitrocompound against *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **98**:141-144.
- *Paglini–Oliva P., Fernández A.R., Fretes R., Peslman A., (1998). Structural, ultrastructural studies and evolution of *Trypanosoma cruzi* – infected mice treated with Thioridazine. Exp. Mol. Pathol. **65**: 78-86.
- *Petray P.B., Morilla M.J., Corral R.S., Romero E.L., (2004). In vitro activity of Etanidazole against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **99**: 233-235.
- *Raether W., Hanel H., (2003). Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. Parasitol. Res. **90**:S19-S39.
- *Ribeiro A., Piló – Veloso D., (1997). Trypanocidal flavonoids from *Trixis vauthieri*. J. Nat. Prod. **60**: 836-838.



- *Rico D., (2004). Respuesta inmune celular contra cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*: papel de las citocinas. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM.
- *Rosenberg A., and Knox S., (2006). Radiation sensitization with redox modulators: a promising approach. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **64**: 343-354.
- *Sánchez A.M., Jiménez – Ortiz V., Sartor T., Tonn C.E., García E.E., Nieto M., Burgos M.H., Sosa M.A., (2005). A novel icetexane diterpene, 5 – epi – icetexone from *Salvia gilliessi* is active against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **98**: 118.-124.
- *Sosa S., (2003). Respuesta inmune celular contra cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM.
- *Strategic direction for research. <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>
- *Takle G., B., and Snary D., (1993) South American Trypanosomiasis (Chaga's disease) In *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*. Edited by Kenneth S. Warren. Blackwell Scientific Publication United Kingdom: 213 – 236.
- *Tay J., Velasco O., Lara R., Gutiérrez M. (1998). *Parasitología Clínica*. Editores Méndez. México 6ª edición: 113-117.
- *Tran A.N., Andersson B., Pettersson U., Aslund L., (2003). Trypanothione synthetase locus in *Trypanosoma cruzi* CL Brener strain shows an extensive allelic divergence. : *Acta Trop.* **87**:269-78.
- *Urbina J.A. and Docampo R., (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversias and advances. *Trends Parasitol.* **11**: 495-501.
- *Urtasun R.C., Palmer M., Kinney B., Belch A., Hewitt J., Hanson J., (1998). Intervention with the hypoxic tumor cell sensitizer Etanidazole in the combined modality treatment of limited stage small-cell lung cancer. A one – institution study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **40**: 337-342.



- *Velasco A., San Román L., Serrano J., Martínez-Sierra R., Cadavid I., (2003). Farmacología Fundamental. Editado por Mc. Graw Hill Interamericana 16ª edición: 79-81.
- *Veloso V.M., Carneiro C.M., Toledo M.J.O., Lana M., Chiari E., Tafuri W.L., Bahia M.T., (2001) Variation in susceptibility to Benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **96**:1005-1011.
- *Villareal D., Barnabé C., Sereno D., Tibayrenc M., (2004). Lack of correlation between in vitro susceptibility to Benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. Exp. Parasitol. **108**: 24-31.
- *Wang F., Lee T., Wang C., (2002). PEG modulated release of Etanidazole from implantable PLGA/PDLA discs. Biomaterials. **23**: 3555-3566.
- *Wayne W.D., (1979). Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa 1ª edición México: 155-191.
- *WHO. Expert Committee on the Control of Chagas disease.2002. WHO Technical Report Series 905: i-vi 1 -109 World Health Organization.

Anexo A. Técnica para dividir Cultivos de Células Vero.

- a. Eliminar el sobrenadante de la caja de cultivo.
- b. Agregar EDTA (5mM) (Ver Anexo A.1).
 - b.1 cajas de 25 cm agregar de 1.5 mL – 2.0 mL.
 - b.2 cajas de 75 cm agregar de 3.0 mL – 4.0 mL.
- c. Incubar de 5 a 10 minutos aproximadamente. Pasado ese tiempo retirar el EDTA y éste se tira.
- d. Agregar tripsina (1mg/mL). (Ver Anexo A.2).
 - d.1 cajas de 25 cm agregar de 0.5 mL – 1.0 mL.
 - d.2 cajas de 75 cm agregar de 1.0 mL – 2.0 mL.
- e. Incubar 2 a 10 minutos aproximadamente y dar pequeños golpecitos para ayudar a despegar las células.
- f. De esta solución de tripsina con células se toman alícuotas de aproximadamente 0.5 mL y se vierten en cajas nuevas.
- g. Inmediatamente agregar medio D – MEM al 10% o 5% (Ver Anexo B).
 - g.1 cajas de 25 cm agregar de 5 mL – 7 mL.
 - g.2 cajas de 75 cm agregar de 15 mL – 30 mL.
- h. Incubar a 5% de CO₂, 90% de humedad y 37° C. Se afloja un poco la tapa para que exista un buen intercambio de gases.

Anexo A.1. Preparación de EDTA.

Preparación de solución Stock 0.5 M.

- a. Pesar 14.6125 g de EDTA.
- b. Disolver en PBS 1X y aforar a 100 mL con la misma solución (Ver Anexo A.1.1).

Preparación de la solución de trabajo EDTA 5 mM.

- a. Tomar 1mL de la solución Stock y aforar a 100 mL con PBS 1X (Ver Anexo A.1.1).

- b. Esterilizar con membrana de 0.22 μM y conservar a 4° C.

Anexo A.1.1. Preparación de PBS 1X.

Preparación de PBS 20x.

- a. Pesar las siguientes cantidades de los siguientes reactivos.
 - a.1 Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 7.2g (BAKER No. Cat. 3828-20).
 - a.2 Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 22 g (BAKER No. Cat. 3818).
 - a.3 Cloruro de Sodio (NaCl) 180 g (SIGMA No. Cat. 5 – 9888).
- b. Disolver en agua bidestilada y aforar a 1L.

*A partir del PBS 20X se prepara el PBS 1X.

Anexo A.2. Preparación de la solución de Tripsina (1 mg/mL).

- a. Pesar 100 mg de Tripsina.
- b. Disolver en PBS 1X y aforar a 100 mL con la misma solución (Ver Anexo A.1.1).
- c. Esterilizar con membrana de 0.22 μm y conservar a 4° C.

Anexo B. Preparación de Medio D – MEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) y complementación.

- a. Disolver un sobre de D –MEM (GIBCO BRL Cat. No. 12100 - 038) alto en glucosa en 900 mL de agua desionizada y destilada. Adicionar 3.7 g de NaHCO_3 (Tissue Culture Grade No. Cat. 895 – 1810) por litro y ajustar el pH entre 7.1 – 7.3 con NaOH y HCl.
- b. Una vez ajustado el pH aforar a 1L.
- c. Esterilizar por filtración al vacío con membrana de 0.22 μm en la campana de flujo laminar y vaciar el medio estéril en botellas de vidrio con tapón de baquelita (secas y estériles) y dejar 48 h como prueba de esterilidad.
- e. Si durante la prueba de esterilidad el medio continúa siendo completamente transparente, de color rojo y al microscopio no se observan bacterias, se procede a complementar.
- f. Complementación.
 - f.1. El medio se filtra al vacío por membrana de 0.22 μm en la campana de flujo laminar.
 - f.2. Agregar los volúmenes de los siguientes componentes:

Componente	Concentración	Para 500 mL
L – glutamina *Ver Anexo b.1	1%	5 mL
aminoácidos esenciales	1%	5 ml
Piruvato	1%	5 ml
Vitaminas	1%	5 ml
Antibióticos * Ver Anexo b.2	1%	5 ml

- f.3. Agregar la cantidad deseada de Suero Fetal Bovino (inactivado) dependiendo del % que se desee de éste (5% adicionar 25 mL por cada 500 mL de medio, si es al 10% adicionar 50 mL por cada 500 mL de medio).

Anexo B.1.Preparación de L – Glutamina.

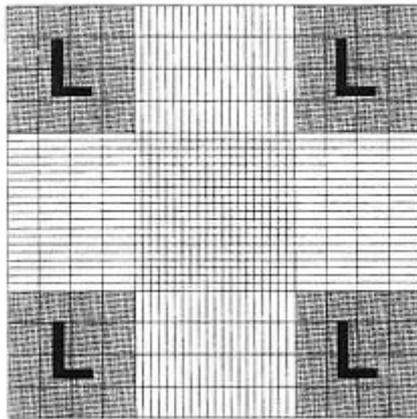
- a. Pesar 2.92 g de L – Glutamina.
- b. Disolver en PBS 1X y aforar a 100 mL (Ver Anexo J Preparación de PBS 1X).
- c. Esterilizar con membrana de 0.22 μ M en la campana de flujo laminar.
- d. Conservar en tubos o frascos pequeños y congelar si no se va a utilizar de inmediato.

Anexo B.2.Preparación de Antibióticos.

- a. Pesar 0.6 g de penicilina y 1.0 g de estreptomicina.
- b. Disolver con PBS 1x y aforar a 100 mL (Ver Anexo J Preparación de PBS 1X).
- c. Esterilizar con membrana de 0.22 μ M en la campana de flujo laminar.
- d. Conservar en tubos o frascos pequeños y congelar si no se va a utilizar de inmediato.

Anexo C. Utilización de la cámara de Neubauer.

- a. Preparar una dilución de la solución de parásitos o células a evaluar.
- b. Tomar una alícuota de 10 μL de la solución preparada e introducirla en los dos compartimentos de la cámara.
- c. Realizar el conteo de parásitos (por duplicado) en la zona marcada con la letra **L** como se muestra en la siguiente figura:



- d. Obtener el número de células/mL utilizando la siguiente fórmula:

$$A \times B \times 10 \times 1000 = \frac{\text{número de células}}{\text{mL}}$$

Donde: A = número de células contadas

B = factor de dilución

10 = volumen de la cámara de Neubauer

1000 = factor de conversión a mL

Anexo D. Preparación del Colorante Giemsa.

Solución Madre.

- a. Se pesan 0.75 gramos de Colorante Giemsa (SIGMA No. Cat. 51811-82-6) y se disuelven en 65 mL de metanol y 35 mL de glicerina pura.
- b. Se filtra con un papel filtro Whatman del No. 1.
- c. Se guarda en un frasco ámbar bien tapado.

Solución de trabajo.

- a. Se diluyen 5 mL de solución madre de Giemsa en 45 mL de PBS 1x.

Anexo E. Tratamiento de las laminillas de teflón (Cell – line 10 – 476) anterior al ensayo de infección.

- a. Las laminillas se sumergen 18 horas en etanol al 70%.
- b. Se lavan 10 veces con agua corriente utilizando una caja Coplin.
- c. Se agrega HCl 1N en la caja Coplin y se pone en agitación durante 30 minutos.
- d. Se lavan 10 veces con agua corriente.
- e. Se agrega PBS 1X y se dejan en agitación durante 30 minutos.
- f. Se lavan 10 veces con agua corriente.
- g. Una vez lavadas cada una de las laminillas se coloca dentro de una caja Petri de 100 x 15 mm sobre un papel filtro del número 1 (Whatman No. Cat. 0531)
- i. Se esterilizan a 120° C, a 1 atm de presión durante 30 minutos.

Anexo F. Método Probit

Este método se utiliza para determinar las dosis letales medias o dosis efectivas medias (DL_{50} , DE_{50}) a partir de una curva dosis – respuesta cuantales. Las curvas dosis – respuesta cuantales relacionan la frecuencia con la que la dosis de un fármaco provoca una respuesta fija del tipo “todo o nada” (muerte del organismo, presentación del estro, convulsiones hipoglucémicas, etc) ya sea in vitro o in vivo. Cuando los resultados obtenidos se llevan a un sistema cartesiano, poniendo en las abscisas la dosis y en las ordenadas el número de organismos que reaccionan, se obtiene una gráfica que no es adecuada para el análisis por lo que debe ser transformada. A partir de lo anterior, se construye una gráfica colocando en el eje de las abscisas la dosis del fármaco y en las ordenadas las frecuencias acumuladas o el porcentaje de individuos que responden al fármaco; entonces se obtiene una curva de tipo sigmoide, que mejora su representación si en lugar de colocar en las abscisas la dosis del fármaco se pone el logaritmo de la misma. Esta variante también sigmoide, es simétrica y la parte central es una línea recta; sin embargo, los extremos de la curva no son lineales y las respuestas en el límite se encuentran en las asíntotas. Finalmente, esta curva puede transformarse en recta mediante un artificio de cálculo denominado “probits” (Velasco et al., 2003).

La transformación de esta curva en una recta se basa en la transformación del porcentaje de respuestas que va en las ordenadas, en desviaciones de la distribución normal y se obtiene una desviación normal equivalente (definida como la abscisa correspondiente a un valor de probabilidad P en una distribución normal con media 0 y varianza 1). Al añadir cinco unidades a los valores de la desviación normal equivalente, con el fin de eliminar las cifras negativas, se obtiene los “probits” (contracción de las palabras probability unit). Se define el “probit” como una unidad de respuestas obtenida por la adición de cinco unidades a cada uno de los valores de la desviación normal equivalente, obtenida ésta a su vez del porcentaje de respuesta

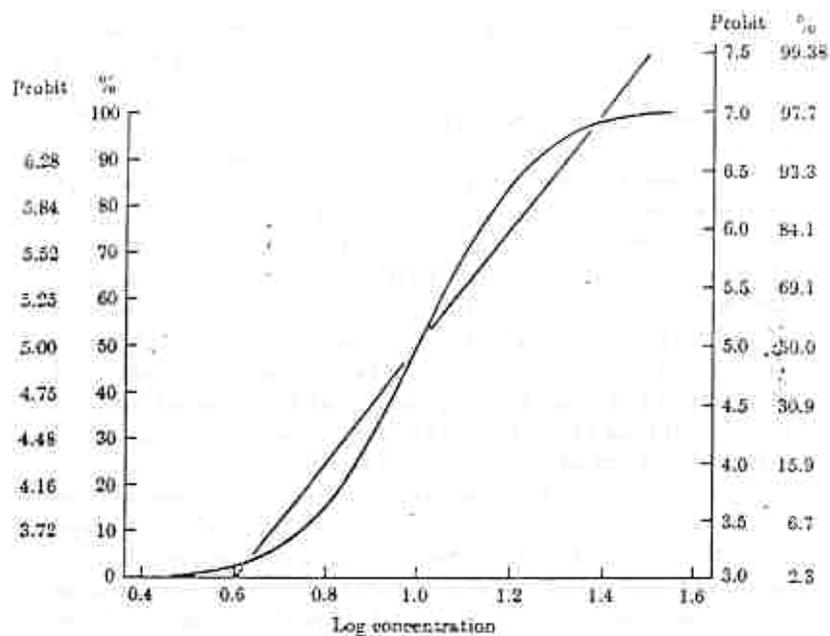
obtenida (Velasco et al., 2003; Finney, 1977). Existen tablas que permiten obtener el valor de los probits a partir del % de respuesta obtenido como se muestra a continuación:

Transformación de % de respuesta a Probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.06	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Finney, 1977

El valor de probit correspondiente al % de respuesta va a tener una relación lineal con la dosis del fármaco, lo cual se ilustra en la siguiente figura.



Finney, 1977

A partir de esta relación lineal puede calcularse la dosis efectiva media, la que se considera como la dosis a la cual el valor de Y es 5. (Velasco et al., 2003; Finney, 1977).

LISTA DE ABREVIATURAS

%AA	Porcentaje de Actividad Anti - amastigote
BALB/c	Cepa de ratón cuyo origen deriva del albino Bagg (1913)
D-MEM	Dulbecoo's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DL ₅₀	Dosis Letal 50. Concentración a la cual el % de parásitos vivos es 50%
g/m ²	Medida de concentración empleada en cáncer que especifica los gramos de fármaco a emplear por m ² de la zona a aplicar la radiación
GSH	Glutación Reducido
GSSG	Glutación Oxidado
HCl	Ácido Clorhídrico
HGPRT	Hipoxantina – Guanina Fosforibosil Transferasa
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50. Concentración a la cual se reduce en un 50% el crecimiento de amastigotes
µm	Micrómetros
µM	Concentración micromolar
mM	Concentración milimolar
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reducido
PBS	Buffer de Fosfatos Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RAPD	Amplificación al azar de DNA Polimórfico
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SFB	Suero Fetal Bovino
TRIS	Trizma Fosfato Monobásico
T(SH) ₂	Tripanotión reducido
T(S) ₂	Tripanotión oxidado
WHO	World Health Organization
Z1	Zimodema 1
Z2	Zimodema 2
Z3	Zimodema 3