

302827

26

24



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U. N. A. M.

**CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE TRES  
AISLADOS DE TRYPANOSOMA CRUZI.  
SUSCEPTIBILIDAD A FARMACOS.**

T E S I S.

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

**GISELA IVETTE PAEZ SANTIBAÑEZ**

MEXICO, D.F.

1996.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

**El presente trabajo se realizó en el  
Departamento de Parasitología de la  
E.N.C.B. - IPN, bajo la dirección del  
Dr. en C. Benjamín Noguera Torres.**

**DEDICO EL PRESENTE TRABAJO:**

**A DIOS:** Por todas las cosas maravillosas que me ha dado.

**A MIS PADRES QUE TANTO AMO:**

**ING. FRANCISCO PAEZ FLORES**

**L.A.E. GISELA SANTIBAÑEZ DE PAEZ**

Porque me dieron la vida y me han brindado su amor, su confianza y su apoyo siempre. No tengo palabras para expresarles todo mi agradecimiento más que de esta forma.

**A MIS HERMANOS PACO Y FE:** Simplemente por eso.

Son..... Lo máximo.

**A TI RAFAEL:**

Por ser mi amigo, mi amor, mi compañero, mi todo.

Gracias por tu apoyo y comprensión.

**A RAFAELITO:**

Por ser el motivo de nuestras vidas.

**A TI:**

Que llegarás pronto , un motivo más para agradecer.

**LOS AMO.**

**A TI MONI:**

Por tu bellísima amistad, por tu ayuda incondicional, por tu confianza,

por todos los momentos que compartimos juntas y por los que vienen.

**A EL PROFESOR BENJAMIN NOGUEDA TORRES:** Por sus consejos, su ayuda , su  
aguante y su sentido del humor.

**A MIS PROFESORES Y AMIGOS:**

Q.F.B. GRACIELA SOSA

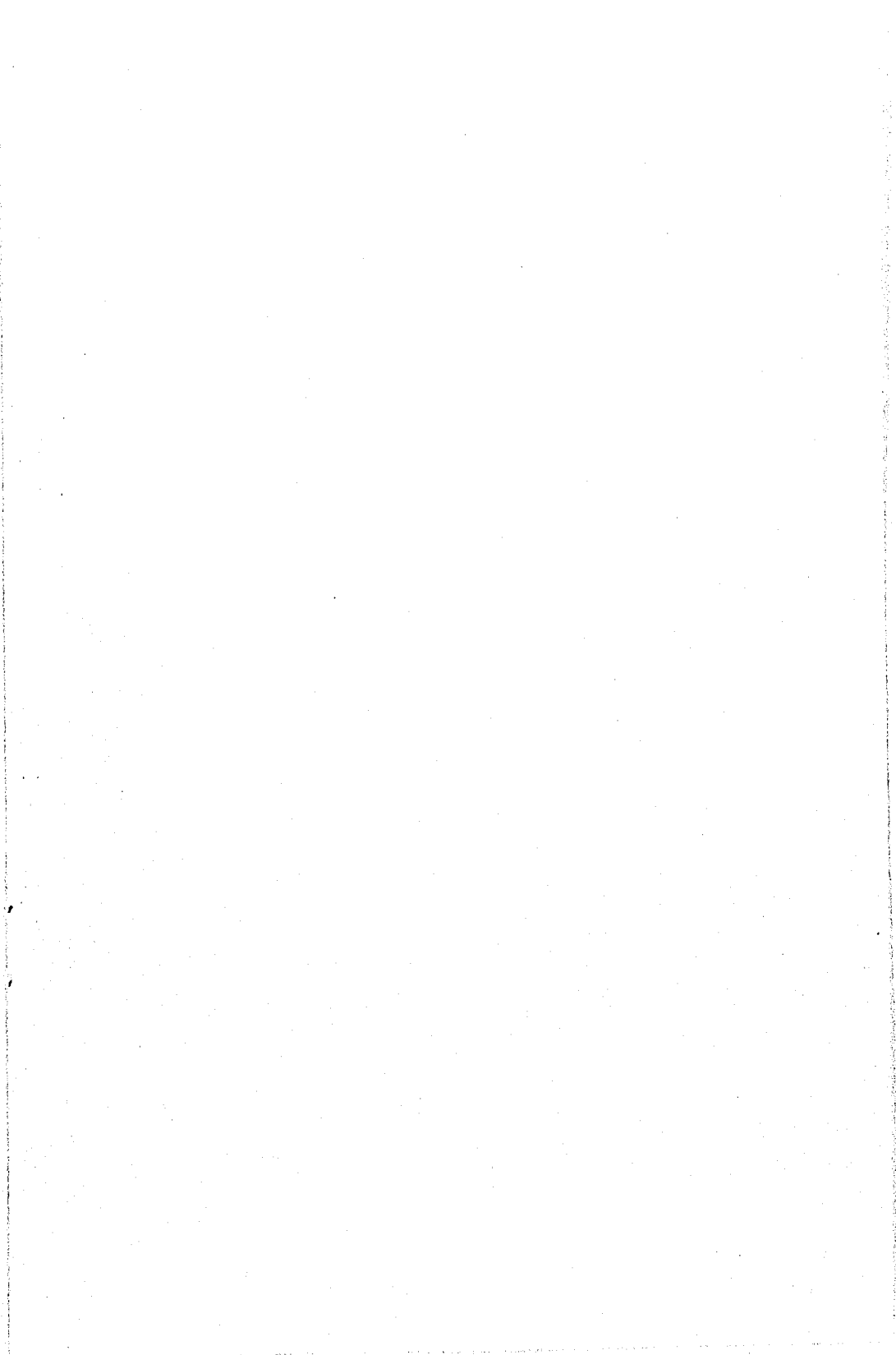
M. en C. RICARDO ALEJANDRE AGUILAR

Q.F.B. LUIS ISITA TORNELL

**A LA MADRE ENRIQUETA:**

Por su amistad y sus ánimos.

Los quiero.



## INDICE

<b>Capítulo I</b>	<b>INTRODUCCION</b>	
<b>1.1</b>	<b>Planteamiento del problema</b>	<b>1</b>
1.1.1	Importancia de la parasitosis	2
1.1.2	Situación actual de la quimioterapia	3
<b>1.2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>5</b>
<b>Capítulo II</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>2.1</b>	<b><i>Trypanosoma cruzi</i></b>	<b>7</b>
2.1.1	Posición taxonómica	7
2.1.2	Transmisión del parásito	8
2.1.3	Mecanismos de patogenicidad	11
2.1.4	Biología del parásito	13
2.1.5	Metabolismo	16
2.1.5.1	Productos finales del metabolismo de la glucosa	17



2.2	Quimioterapia	18
2.2.1	Desarrollo histórico de la quimioterapia	18
2.2.2	Blancos quimioterapéuticos en <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
2.2.3	Modo de acción de los fármacos	21
Capítulo III	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	
3.1	Diagrama de flujo general	27
3.2	Material, reactivos y equipo	28
3.2.1	Material biológico	28
3.2.2	Material de laboratorio	28
3.2.3	Reactivos	29
3.2.4	Equipo	30
3.3	Preparación de soluciones	30
3.4	Metodología	31
3.4.1	Determinación de la actividad de los fármacos	
	Inhibidores <i>in vitro</i>	31
3.4.2	Determinación de la actividad de los fármacos	
	Inhibidores <i>in vivo</i>	32

Capitulo IV	RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1 Resultados		35
4.1.1 Actividad tripanomicida de los compuestos sobre <i>T. cruzi</i>		35
4.2 Discusión		46
Capitulo V	CONCLUSIONES	
5.1 Conclusiones		49
BIBLIOGRAFIA		50

## CAPITULO I

## INTRODUCCION

### 1.1 Planteamiento del problema

La infección de seres humanos por *Trypanosoma cruzi* provoca la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. Desde su descubrimiento por el doctor Carlos Chagas, ésta zoonosis ha marcado un hito dentro de la parasitología, ya que fue el primer caso en que primero se describe al agente etiológico, al transmisor y finalmente a la enfermedad que ocasiona (Soberón y Peláez, 1977).

La presencia de una alta variación intraespecífica de *T. cruzi* ha sido ampliamente reconocida desde los inicios en la investigación sobre este parásito. Es notable la extrema variabilidad de las formas clínicas en que se presenta la Enfermedad de Chagas, teniéndose cuadros severos de cardiopatías y/o dilatación de segmentos del tracto digestivo, hasta una aparente ausencia de síntomas en muchos y variados pacientes en la forma indeterminada (Faust y cols, 1980).

### 1.1.1 importancia de la parasitosis

La importancia de la enfermedad de Chagas radica en:

- a) Su amplia distribución geográfica desde el sur de Estados Unidos de Norteamérica hasta aproximadamente el paralelo 41 de latitud sur en Chile y Argentina.
- b) Su alta morbilidad: se calcula que existen alrededor de 24 millones de personas infectadas. Es, después de la malaria, la enfermedad transmitida por artrópodos más frecuente en Latinoamérica.
- c) Hasta el momento no hay medidas de control satisfactorias para este padecimiento, ya que no existen vacunas; el control de los transmisores a través de insecticidas es tan costoso que lo hace inoperante para gobiernos siempre en crisis, y la quimioterapia es aún inadecuada, ya que los fármacos de elección presentan una alta incidencia de efectos colaterales y además de que no está claro si éstos fármacos producen la cura parasitaria (Morello, 1987).

En México el padecimiento es endémico y existen localidades en que se propone que se considere a la enfermedad de Chagas un problema de salud pública (Velasco, 1987).

La enfermedad de Chagas afecta la mayor parte de Sudamérica, Centroamérica y México, se calcula que existen 240,000 casos por año, por lo que se ha considerado dentro de las seis enfermedades parasitarias más importantes en el mundo (W.H.O. 1982, W.H.O. 1990). La forma aguda de la enfermedad es tratada con compuestos nitrofuranos

(Lampit y Radanil), los cuales han mostrado, en algunos casos, buenos resultados, pero como son altamente tóxicos y carcinogénicos (W.H.O., 1990), estos compuestos no se emplean en el tratamiento de la enfermedad en la etapa crónica (los cuales representan el 95% de los casos), por lo que esas personas enfermas no reciben tratamiento (Gallerano, 1990), situación que representa un problema epidemiológico, ya que actúan como reservorios del parásito (Velasco y cols., 1991).

Debido a la gran diversidad de cepas que existen de *Trypanosoma cruzi*, es necesario el probar los fármacos existentes para evidenciar en estas cepas las diferencias de susceptibilidad y/o resistencia.

#### **1.1.2 Situación actual de la quimioterapia**

La quimioterapia de la Enfermedad de Chagas es aún inadecuada ya que los fármacos de elección, Nifurtimox (Lampit) y Benznidazol (Radanil), son parcialmente efectivos en el tratamiento de la enfermedad aguda y son ineficientes en el tratamiento de la fase crónica de la enfermedad (W.H.O., 1990). Además que se han descrito cepas del parásito resistentes a ambos medicamentos (Brener y cols, 1984) y la necesidad de aplicar regímenes de dosis elevadas durante períodos prolongados, debido a la relativa falta de potencia del nifurtimox y del benznidazol, origina que frecuentemente se presenten serios efectos colaterales, tales como anorexia, urticaria, neuritis periférica y psicosis. Todo esto resulta finalmente en que se reconozca, desde hace tiempo, la necesidad crítica de un mejor medicamento para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas (Chabala, 1991, Schofield 1992).

Debido a que no se han desarrollado nuevos compuestos "guías" a través de síntesis al azar o por programas de ensayos de la actividad de numerosos compuestos, las investigaciones recientes se han centrado en el estudio de la Bioquímica y la Biología molecular de los tripanosomas, buscando diferencias metabólicas entre el parásito y el hospedero que pudieran ser explotadas como blancos para el desarrollo de nuevas drogas (Noguera y cols., 1991).

## 1.2 Objetivos

### Objetivo General:

Evaluar la susceptibilidad de tres cepas de *Trypanosoma cruzi* al Gosipol, Radanil y Lampit.

### Objetivos Particulares:

1. Evaluar la actividad tripanocida in vitro del Gosipol, Radanil y Lampit para las cepas COMPOSTELA, PARRA y VILLA de *Trypanosoma cruzi*.
2. Evaluar la actividad tripanocida in vivo del Gosipol, Radanil y Lampit para las cepas COMPOSTELA, PARRA y VILLA de *Trypanosoma cruzi*.
3. Comparar la correlación entre las pruebas in vitro e in vivo de evaluación de fármacos.



## CAPITULO II

## ANTECEDENTES

### 2.1 *Trypanosoma cruzi*.

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es *Trypanosoma cruzi*, un protozoo parásito flagelado que es transmitido al hombre y otros mamíferos por insectos hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), por un mecanismo contaminativo astercorario

#### 2.1.1 Posición taxonómica ( Levine, 1980 ).

Reino	Animal
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophora
Super orden	Parabasalidea
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Género	Trypanosoma
Especie	cruzi

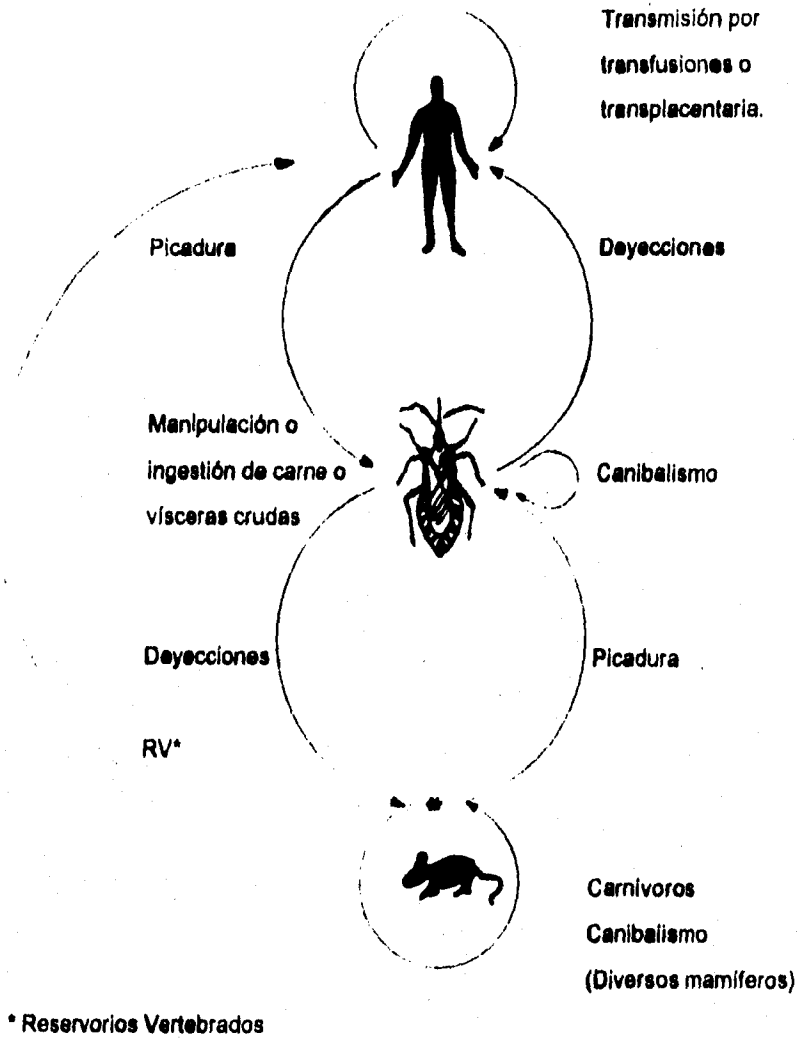
### 2.1.2 Transmisión del parásito

Los triatomíneos se infectan al ingerir tripomastigotes de la sangre periférica de mamíferos infectados. En la luz del mesogastrio de los insectos, los organismos se multiplican asexualmente en forma de epimastigote y, después de un período de 15 a 30 días, su proliferación conduce a la formación de tripomastigotes metacíclicos en el recto del insecto. Estas formas infecciosas se expulsan con las heces del triatomino y los tripomastigotes inician la infección en nuevos huéspedes al penetrar por las abrasiones de la piel o por las membranas mucosas. Esta transmisión se denomina "de estación posterior" o "por contaminación". En la tripanosomiasis africana las formas infecciosas están asociadas a las partes bucales del insecto vector y se introducen a los nuevos huéspedes por la picadura del insecto (de "estación anterior" o transmisión por "inoculación").

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

Posteriormente los amastigotes se transforman en tripomastigotes y, al romperse las células, quedan libres para invadir otras células o para ser ingeridas por un insecto. (Alarcón, 1976) (fig 1,2).

Fig. 1 CICLO DE TRANSMISION DE *Trypanosoma cruzi*.



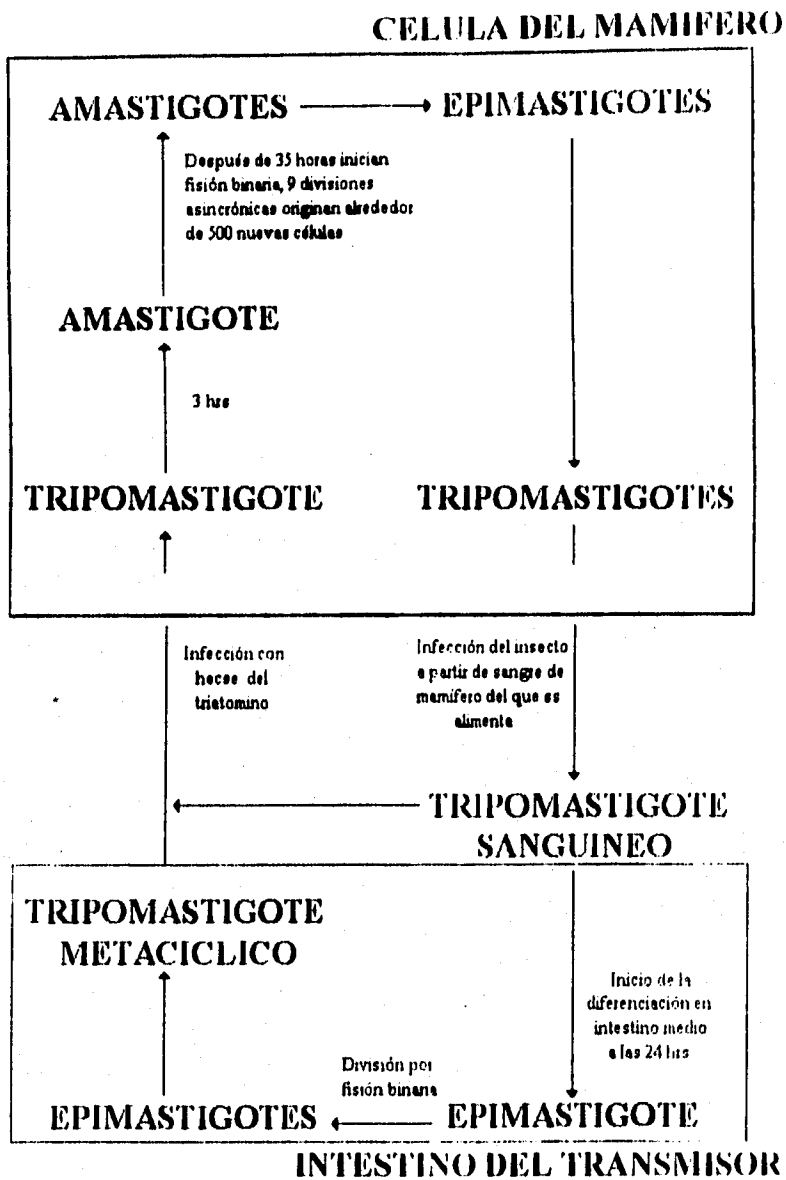


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

### 2.1.3 Mecanismos de patogenicidad

La entrada de los tripomastigotes metacíclicos produce una reacción inflamatoria aguda local. En una o dos semanas se diseminan a los ganglios linfáticos regionales y se empiezan a multiplicar en las células que los fagocitan. Los amastigotes intracelulares efectúan repentinas divisiones formando grandes cantidades de parásitos que producen los llamados pseudoquistes. Después de unos días, algunos de los microorganismos se transforman en tripomastigotes y salen del pseudoquiste destruyendo la célula que los contiene. Entonces ocurre una parasitemia generalizada y casi cualquier tipo de tejido puede ser invadido, aunque el parásito muestra marcada preferencia por los músculos y células nerviosas. En las células recién invadidas, se repite nuevamente el cambio a amastigote, formación del pseudoquiste, transformación a tripomastigote y ruptura del pseudoquiste. Esta ruptura se acompaña de la respuesta inflamatoria local aguda con degeneración y necrosis de las células nerviosas de las regiones vecinas, especialmente células ganglionares. Este es el cambio patológico más importante en la enfermedad de Chagas, cuyo mecanismo no se conoce bien, sin embargo, se ha atribuido a la liberación de toxinas en el momento de la ruptura de los pseudoquistes y a la destrucción de los amastigotes restantes.

La enfermedad de Chagas presenta un período agudo y uno crónico. El período agudo se inicia con la entrada en la piel de los tripomastigotes contenidos en las heces de las chinches. La inflamación local produce un pequeño nódulo rojo conocido como chagoma, con edema de los nódulos linfáticos regionales. En aproximadamente el 50% de los casos los tripomastigotes penetran por la conjuntiva del ocular produciendo edema parpebral y de la conjuntiva, así como hinchazón de los ganglios linfáticos y preauriculares, estos síntomas se conocen como Signo de Romaña. Al progresar la fase

aguda de la enfermedad, se pueden encontrar pseudoquistes en casi cualquier órgano del cuerpo, aunque la intensidad en el ataque varía de unos a otros. Generalmente es invadido el músculo cardíaco con la pérdida de casi el 80% de las células ganglionares cardíacas. Entre los síntomas de la fase aguda se incluyen anemia, pérdida de fuerza, disturbios nerviosos, escalofríos, dolores de huesos y músculos, así como algunos trastornos cardíacos. La muerte suele presentarse de 3 a 4 semanas después de la infección. La fase aguda es más común y grave entre los niños menores de 5 años de edad.

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

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

#### 2.1.4 Biología del parásito.

Como todos los protozoarios de la familia *Trypanosomatidae*, *Trypanosoma cruzi* posee una estructura celular característica, el cinetoplasto, constituido por ADN y una doble membrana mitocondrial que lo envuelve y se extiende a toda la célula constituyendo de esa manera una mitocondria gigante única.

*Trypanosoma cruzi* presenta en preparaciones teñidas, e partir de frotis sanguíneos, una morfología característica, ya que adopta forma de "c" o de "u". Tiene una longitud aproximada de 20 micras, un cinetoplasto muy grande de posición subterminal. Posee además, un flagelo libre y membrana ondulante estrecha. Este forma corresponde e la de tripomastigote, ya que el parásito presente diferentes fases de desarrollo, dependiendo del huésped en el que se encuentre.

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

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



a) Amastigote.- Sin flagelo protuberante, son organismos de forma esférica u ovalada; se reproducen intracelularmente en el huésped vertebrado por fisión binaria; presenta un cinetoplasto en forma de bastoncillo y un núcleo grande.

b) Epimastigote.- Presentan el cinetoplasto en posición anterior cerca del núcleo y un flagelo que al principio lo contornea una pequeña membrana ondulante; son organismos fusiformes, que se multiplican en el tubo digestivo del vector y en medios de cultivo.

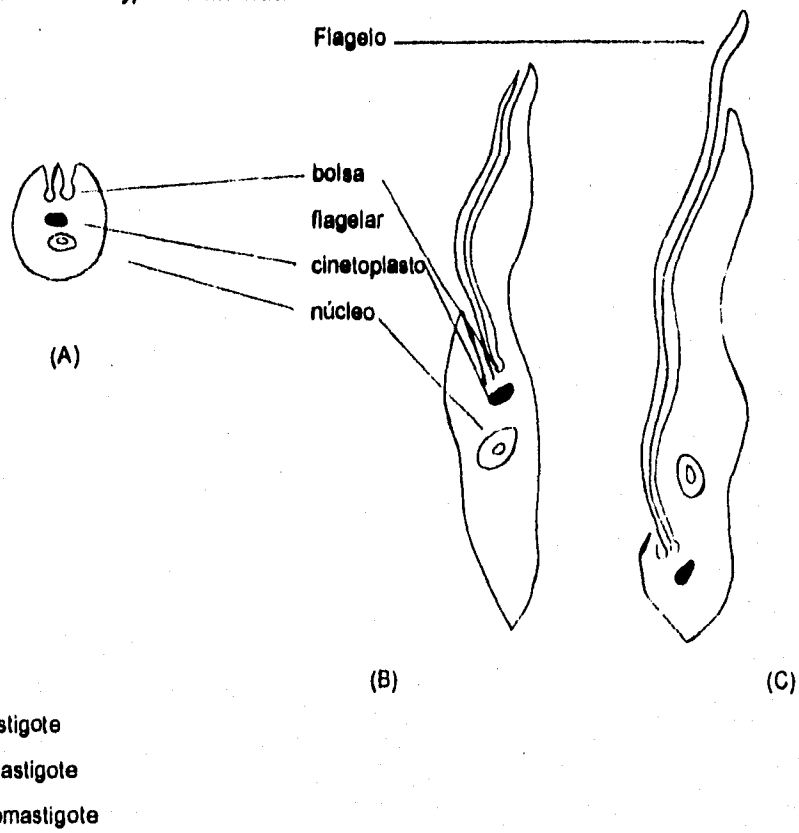
También se localizan dentro de las células del vertebrado durante el final del ciclo intracelular cuando los amastigotes se transforman en tripomastigotes o viceversa, en el comienzo de un nuevo ciclo (De Souza, 1984).

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

- Tripomastigote sanguíneo.- Se encuentra en la sangre del hospedero vertebrado y constituye la fase infectante para los triatomíneos, cuando estos ingieren sangre de un hospedero infectado.

- Tripomastigote metacíclico.- Aparece a la luz del intestino del insecto transmisor, (Reduviidae, Triatominae) y representa la fase infectante para los huéspedes vertebrados (Sánchez, 1987) (fig. 3).

Fig. 3 FASES DE *Trypanosoma cruzi*.



### 2.1.5 Metabolismo

La bioquímica de este protozoo implica procesos comunes a otros eucariotes:

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

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

- a) la incapacidad para sintetizar bases púricas y pirimidicas.

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

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

La glicólisis juega un papel muy importante en el aporte energético para el parásito, ya que a pesar de que se ha informado la presencia de todas las enzimas del ciclo de Krebs, este ciclo sólo es utilizado parcialmente y además, en sentido inverso. La glucosa

es catabolizada sólo parcialmente a  $\text{CO}_2$  aún bajo condiciones aeróbicas, con la producción principalmente de succinato, el cual es producido por la siguiente secuencia de reacciones: la fijación de  $\text{CO}_2$  por la fosfoenolpiruvato carboxinasa produce ácido oxalacético, el cual es reducido a ácido málico, esto sucede dentro de los glicosomas. El malato sale al citosol y penetra a la mitocondria donde es convertido a fumarato y finalmente a succinato. El succinato es el producto final del metabolismo energético en *T. cruzi* (Gutteridge, 1981) seguido por la alanina y el acetato, este último en poca cantidad, al igual que el lactato, malato y piruvato (Cazzulo, 1992).

## **2.2 Quimioterapia**

Se conoce actualmente que el tratamiento de la Enfermedad de Chagas es todavía un problema no resuelto y entre los programas de investigación de las organizaciones de los países más afectados y de los organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud, destaca la búsqueda de nuevos medicamentos contra la Enfermedad de Chagas (Turrens, 1986).

### **2.2.1 Desarrollo histórico de la quimioterapia**

Después del descubrimiento de la enfermedad de Chagas en 1909, y hasta 1937, no había sido probado en humanos ningún compuesto químico contra esta enfermedad. A partir de ese año se inició la búsqueda de fármacos con actividad contra *T. cruzi* por diversas industrias farmacéuticas. En la tabla 1 se enlistan los primeros medicamentos que fueron evaluados químicamente. La mayoría de los fármacos evaluados mostraron

poca actividad en la eliminación del parásito a excepción de los derivados 5-nitrofuranos y 2-nitroimidazoles. Los 5-nitrofuranos fueron probados por Packchanian en 1952 encontrando que algunos de ellos presentaban actividad. Brener, en 1961, fue el primero en demostrar que el tratamiento por un período largo con un nitrofurano (Nitrofurazona) presentaba efecto curativo en infecciones experimentales, hechos que motivó el ensayo del fármaco en casos humanos. En 1962 en Alemania, Herlinger, Mayer y Petersen sintetizaron para la casa Bayer un derivado del nitrofurano al que llamaron nifurtimox (cuyo nombre comercial es Lampit), diez años más tarde se demostró que este derivado presentaba mayor actividad comparada con sus análogos estructurales en la eliminación del parásito (Gutteridge, 1980; Brener, 1984).

Entre los derivados del 2-nitroimidazol, el departamento de investigaciones de los laboratorios Roche sintetizó el benzimidazol (nombre comercial Radanil) cuyos primeros resultados fueron presentados en 1977 (Brener, 1984; Gutteridge, 1980).

### 2.2.2 Blancos quimioterapéuticos en *Trypanosoma cruzi*

Glicosomas. Entre los miembros de la familia Trypanosomatidae, la mayoría de las enzimas glicolíticas se localizan en organelos llamados glicosomas. Se piensa que estos organelos están relacionados a peroxisomas o microcuerpos de otras células eucarióticas. Esta división subcelular de la glicólisis en tripanosomas es fundamentalmente diferente a todos los otros organismos eucariotes estudiados, en donde la glicólisis ocurre en el citosol. El glicosoma de *T. cruzi* es una vesícula de una

sola membrana que va de 0.2 a 0.8  $\mu\text{m}$  de tamaño y en las preparaciones al microscopio electrónico su aspecto es globoso.

En *T. cruzi* las primeras seis enzimas glicolíticas (hexocinasa, fosfoglucomutasa, fosfohexosaisomerasa, fosfofructocinasa, aldolasa, triosa fosfato isomerasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) se localizan dentro de los glicosomas.

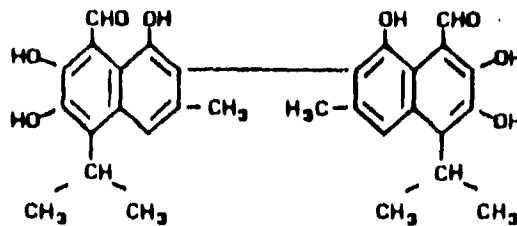
La glicólisis juega un papel importante en el aportamiento energético para el parásito, ya que a pesar que se ha informado la presencia de todas las enzimas en el Ciclo de Krebs, éste ciclo sólo es utilizado parcialmente y además en sentido inverso (Taylor, 1986).

Entre los fármacos con actividad tripanomicida, que actúan utilizando las diferencias del metabolismo glicolítico entre el parásito y su hospedero está el gossipol.

### 2.2.3 Modo de acción de los fármacos

#### GOSIPOL

El Gossipol es un componente polifenólico amarillo, aislado especialmente en las semillas de la planta del algodón.



GOSIPOL

La administración oral de este medicamento produce oligospermia y azoospermia en humanos y otras especies. Su eficiencia como un agente anticonceptivo en humanos, depende de los efectos deletéreos que produce en epitelios seminíferos, también se ha demostrado que atraviesa la barrera sanguínea testicular, lo cual indica que el fármaco penetra membranas celulares y otras barreras permeables. Los estudios clínicos disponibles, sugieren que el compuesto es bien tolerado por humanos en dosis controladas y que la espermatogénesis es completamente restablecida cuando el tratamiento es interrumpido. El gossipol inhibe la motilidad de los espermatozoides tanto in vitro (Poso y cols., 1980) como in vivo (Cameron y cols., 1982).



Los espermatozoides y *T. cruzi* presentan dos características muy importantes en común, que en el caso de los espermatozoides los hace ser diferentes a las demás células del hombre:

a) Son muy sensibles a un estrés oxidativo. Se ha demostrado que ambas células carecen de la catalasa, a pesar de ser capaces de generar peróxido de hidrógeno. El parásito es aún más sensible a peróxidos dado que presentan baja actividad de glutatión peroxidasa.

b) La presencia de un flagelo que está en continuo movimiento con el subsecuente alto gasto energético; además el parásito tiende a replicarse más rápido que las células del huésped, por lo que su gasto energético es aún mucho mayor.

Por lo tanto, el interferir con el metabolismo energético es un blanco contra *T. cruzi*. Se ha demostrado que el gosiol *in vitro* inhibe el crecimiento del parásito a concentraciones semejantes a las requeridas para eliminar espermatozoides. Al parecer el fármaco actúa inhibiendo deshidrogenasas cambiando el estado redox y afectando por lo tanto el metabolismo energético (Turrens, 1986).

Pruebas *in vitro* han mostrado que el gosiol inhibe a la alfa-hidroxiácido y malato deshidrogenasa, enzimas que utilizan  $\text{NAD}^+$  como coenzima. En la tabla 1 se citan las enzimas que son inhibidas por el fármaco (De Burgos y Blanco, 1984; Eid, 1988).

**TABLA 1****Efecto del gospol sobre oxirreductasas de *T. cruzi*.**

<b>ENZIMA</b>	<b>Gospol ( M)</b>	<b>INHIBICION (%)</b>
<b><math>\alpha</math>-hidroxiácido deshidrogenasa</b>	<b>0.5</b>	<b>45.0</b>
<b>Malato deshidrogenasa</b>	<b>0.3</b>	<b>38.2</b>
<b>Glutamato deshidrogenasa</b>	<b>5.0</b>	<b>68.8</b>
<b>Enzima málica</b>	<b>10.0</b>	<b>37.3</b>
<b>Glucosa-6-P- deshidrogenasa</b>	<b>20.0</b>	<b>57.6</b>
<b>Succinato deshidrogenasa</b>	<b>100.0</b>	<b>0.0</b>

**(De Burgos y Blanco, 1984; Eid, 1988).**

## LAMPIT Y RADANIL

En *T. cruzi* se ha informado la presencia de enzimas oxidativas que intervienen en la producción de peróxido de hidrógeno y del anión superóxido, como el citocromo P-450a citocromo c reductasa. En el parásito la eficiencia de eliminación de los peróxidos y los superóxidos está disminuida por la ausencia de catalasa,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico y de glutatión peroxidasa. La actividad de superóxido dismutasa está presente en el protozoo, lo que aunado a la carencia de un sistema efectivo de eliminación de  $H_2O$  lo hace susceptible a los radicales libres (Noguera y cols., 1991).

Ciertas drogas antitripanosoma actúan a través de un incremento intracelular de radicales libres. Estos radicales libres pueden reaccionar con macromoléculas y producir alteraciones en enzimas, membranas y ácidos nucleicos; tienen además otros efectos que originan la muerte del parásito. En la primera reacción del mecanismo generador de radicales libres por nitrocompuestos, se lleva a cabo la transferencia de un electrón del reductor NAD(P)H al grupo nitro catalizada por una enzima nitroreductasa. El segundo paso consiste en la transferencia del electrón libre al oxígeno; regenerando al nitrocompuesto y formando al anión superóxido; este a su vez dismuta a peróxido de hidrógeno de manera espontánea o por acción de la superóxido dismutasa. Por último el  $H_2O_2$  reacciona con el anión superóxido para dar origen al radical hidroxilo. Este radical ha sido postulado como uno de bajo peso molecular más dañino (Docampo, 1984).

El nifurtimox y el benznidazol, ambos nitrocompuestos son los fármacos de elección hasta el momento y su modo de acción es a través de la producción de radicales libres (Moreno, 1988).

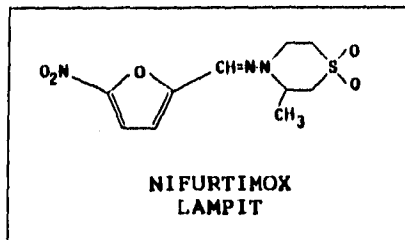


Figura 3. LAMPIT (Nifurtimox)

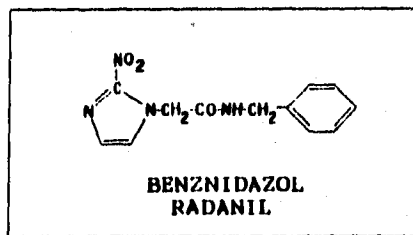
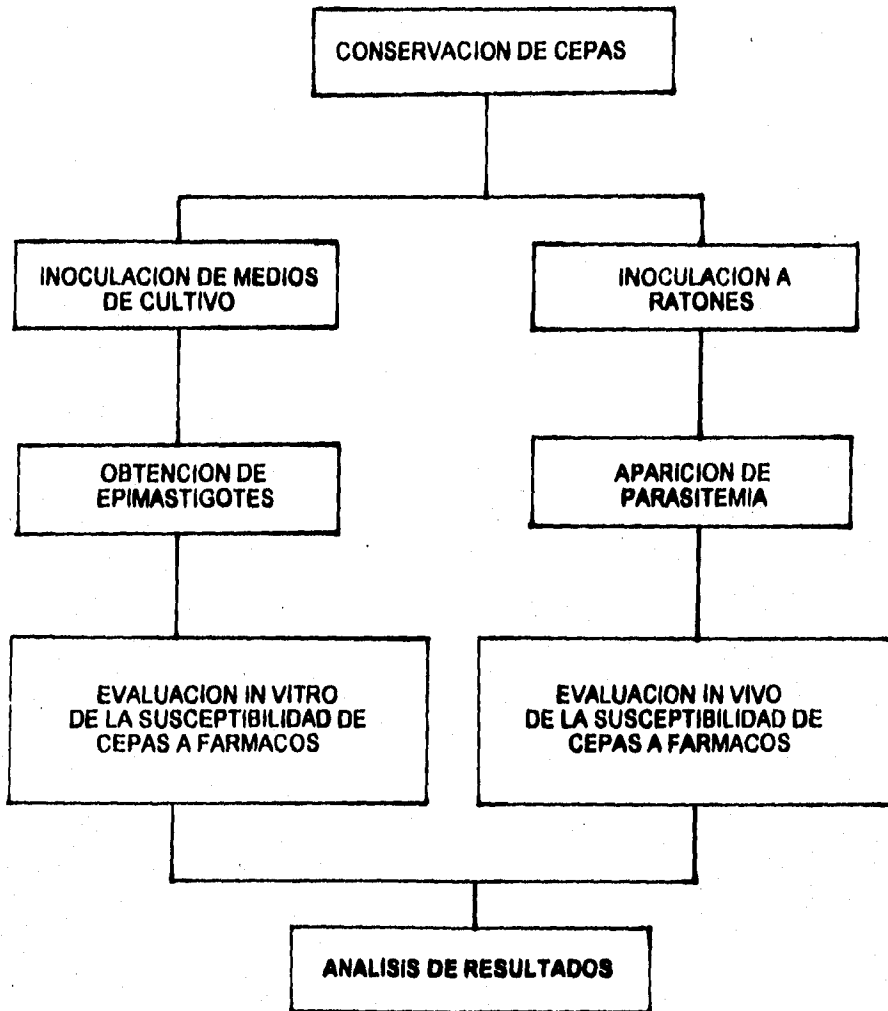


Figura 4. RADANIL (Benznidazol)

### **CAPITULO III**

## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Diagrama de flujo general



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

#### **3.2.1 Material biológico**

- *Trypanosoma cruzi* cepas COMPOSTELA, PARRA y VILLA, aisladas por xenodiagnóstico, y mantenida en el laboratorio por pase ratón-triatómino-ratón.
- Sangre de conejo defibrinada.
- Sangre de carnero (vial).
- Animales de experimentación:
- Ratonés albinos (*mus musculus*)  
Cepa NIH  
Hembras de 20 g de peso

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

- Agitador de vidrio
- Asa bacteriológica
- Balanza analítica
- Balanza granataria
- Celdas espectrofotométricas
- Espátula de acero inoxidable
- Guantes y cubreboca
- Jeringas de 3, 5 y 20 ml

- Matracas Erlenmeyer con tapón de rosca Pyrex (100, 250 y 500 ml)
- Mechero Bunsen
- Micropipetas (50, 100 y 1 000 ul)
- Mortero y pistilo de porcelana
- Pipetas Pasteur
- Pipetas graduadas Pyrex (1, 2, 5 y 10 ml)
- Porta y cubreobjetos
- Porta y cubreobjetos
- Probetas (100 y 500 ml)
- Tela de organza
- Tubos de ensayo Pyrex de 13 x 100
- Tubos eppendorf (1 ml)
- Tubos para centrifuga con tapón
- Vasos de precipitado (100 y 250 ml)

### **3.2.3 Reactivos**

- Acido caprónico (Sigma Chemical Co)
- Base de agar sangre (Dibico)
- Cloruro de sodio (Productos Químicos Monterrey)
- Etanol (Merck)
- Fenol (J.T. Baker)
- Infusión cerebro corazón
- Lampit: Benznidazol: Ro 7-1051.



- Penicilina g cristalina
- Radenil: Nifurtimox: Bayer 2502

### **3.2.4 Equipo**

- Autoclave Industrias Steele Presto modelo 21L
- Incubadora Preciso Gravity Convention Incubator G.C.a.
- Microscopio binocular Zeiss
- Refrigerador Cabhere

### **3.3 Preparación de soluciones**

#### **MEDIO DIFASICO AGAR SANGRE**

Agar base sangre            4 g/lit

Triptosa                        2 g/lit

Una vez que los componentes se solubilizaron, se esterilizaron en autoclave. Cuando la temperatura del medio disminuyó se agregó la sangre estéril desfibrinada de carnero (vial) hasta una concentración final del 10%. Una vez sólido el medio, se agregó la fase líquida, la cual consiste en solución salina al 0.85%. Se dejó una noche previo a la siembra, a 28°C.

#### **CLORURO DE SODIO AL 0.85%**

Se pesaron en la balanza analítica 0.85 g de cloruro de sodio y se disolvieron en 100 ml de agua destilada.

## FENOL AL 5%

Se pesaron 100 g de fenol y se disolvieron en 2 000 ml de agua destilada. La solución se agitó y se conservó en un frasco ambar.

### 3.4 Metodología

#### 3.4.1 Determinación de la actividad de los fármacos inhibidores in vitro.

La metodología que se siguió es la propuesta por Montamat y Blanco (1982). Se prepararon medios de cultivo difásicos y se inocularon tres series de seis con las cepas COMPOSTELA, PARRA y VILLA respectivamente. Los medios se incubaron a 28°C por 12 días, al cabo de estos, se revisó el crecimiento de la población de los diferentes medios.

Se tomaron muestras de 500 µl en tubos eppendorf de los medios con abundantes parásitos no contaminados. Se prepararon diluciones de cada fármaco y se añadieron 3 µl de cada una de éstas a los tubos conteniendo el medio de cultivo; así también en otro tubo eppendorf con medio de cultivo se añadieron 3 µl de etanol absoluto (disolvente de los fármacos), como testigo. Se tomó una muestra con el asa bacteriológica, se colocó en un portaobjetos y encima de éste, un cubreobjetos. Se revisó al microscopio (40X) a los 0,30, 60, 90 y 120 minutos después de haber añadido el fármaco. Al final se deshecharon los porta y cubreobjetos en fenol al 5%. Se reportaron los porcentajes de reducción de la

población de cada capa (parásitos no sobrevivientes), después de haber revisado diez parásitos en cada uno de diez campos.

#### **3.4.2 Determinación de la actividad de los fármacos inhibidores *in vivo*.**

Ratones hembra fueron inoculados intraperitonealmente con 10,000 tripomastigotes sanguíneos. El día de máxima parasitemia o 20 avo. día (establecido en el laboratorio de Entomología) se aplicó por vía oral, una sola dosis de 500 mg/kg de los fármacos a evaluar. El número de tripomastigotes circulantes se determinó de acuerdo al método de Brener y cols. (1984) antes y 2, 4, 6 y 8 después de la aplicación del fármaco. Se emplearon como testigo a ratones tratados de manera similar, pero se empleó agua como placebo. Los porcentajes de la reducción de la parasitemia se calcularon comparando el número de parásitos obtenidos a cada intervalo de tiempo después de la aplicación de los medicamentos.

Cálculo de las dosis administradas:

Radanil: Comprimidos de 260 mg al 38.46% de pureza se maceraron en mortero para facilitar su suspensión en agua y además para pesar la cantidad necesaria de cada dosis. Para administrar una dosis de 500 mg/Kg a ratones de 20 g de peso, se pesaron 520 mg del comprimido y se suspendieron en 20 ml de agua destilada administrándole 1 ml a cada ratón.

**Lampit: Comprimidos de 400 mg al 30% de pureza se maceraron en un mortero para facilitar su suspensión en agua y además para pesar la cantidad necesaria de cada dosis. Para administrar una dosis de 500 mg/Kg de peso, se pesaron 800 mg del comprimido y se suspendieron en 20 ml de agua destilada administrándosele 1 ml a cada ratón.**

## CAPITULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Resultados

#### 4.1.1 Actividad tripanocida de los compuestos sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Los compuestos seleccionados para establecer la comparación de la actividad tripanocida, Gosipol (Tablas I, II y III), Lampit (Tablas IV, V y VI) y el Radanil (Tablas VII, VIII y IX), presentaron actividades que no eliminan las dosis de 1  $\mu\text{M}$ , los epimastigotes de las tres cepas (COMPOSTELA, PARRA Y VILLA) de *Trypanosoma cruzi*. El Gosipol presentó una mejor actividad entre los fármacos probados, así mismo se observa que la cepa PARRA presenta una mayor susceptibilidad a éste fármaco.

TABLA I. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GOSIPOL SOBRE EPIMASTIGOTES DE LA CEPA COMPOSTELA DE *Trypanosoma cruzi*.

CONCENTRACION (MOLAR)	TIEMPO (MINUTOS)				
	0	30	60	90	120
SOBREVIVENCIA (%)					
0.1	100	85	60	50	20
0.01	100	85	65	55	25
0.001	100	80	70	60	45
0.0001	100	80	70	60	50
0.00001	100	80	80	75	70
0.000001	100	90	85	80	80
TESTIGO	100	100	100	100	100

TABLA II. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GOSIPOL SOBRE EPIMASTIGOTES DE LA CEPA PARRA DE *Trypanosoma cruzi*.

CONCENTRACION (MOLAR)	TIEMPO (MINUTOS)				
	0	30	60	90	120
SOBREVIVENCIA (%)					
0.1	100	25	15	10	0
0.01	100	35	20	15	10
0.001	100	40	36	30	25
0.0001	100	50	50	50	50
0.00001	100	90	80	80	80
0.000001	100	90	80	80	80
TESTIGO	100	100	100	100	100

TABLA III. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL GOSIPOL SOBRE EPIMASTIGOTES DE LA CEPA VILLA DE *Trypanosoma cruzi*.

CONCENTRACION (MOLAR)	TIEMPO (MINUTOS)				
	0	30	60	90	120
	SOBREVIVENCIA (%)				
0.1	100	70	65	30	15
0.01	100	80	70	35	25
0.001	100	85	80	70	30
0.0001	100	90	85	75	40
0.00001	100	90	85	85	70
0.000001	100	100	95	90	75
TESTIGO	100	100	100	100	100

TABLA IV. EVALUACION IN VITRO DE LA ACTIVIDAD DEL GOSIPOL SOBRE LAS CEPAS COMPOSTELA, PARRA y VILLA DE *Trypanosoma cruzi*.

CONCENTRACION (MOLAR)	REDUCCION DE LA POBLACION (%)		
	COMPOSTELA	PARRA	VILLA
0.1	20	0	15
0.01	25	10	25
0.001	45	25	30
0.0001	30	50	40
0.00001	70	80	70
0.000001	80	80	75
TESTIGO	100	100	100



TABLA V. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAMPIT SOBRE EPIMASTIGOTES DE LA CEPA COMPOSTELA DE *Trypanosoma cruzi*.

CONCENTRACION (MOLAR)	TIEMPO (MINUTOS)				
	0	30	60	90	120
SOBREVIVENCIA (%)					
0.1	100	90	85	75	65
0.01	100	90	90	80	75
0.001	100	95	90	90	80
0.0001	100	95	90	90	80
0.00001	100	100	95	95	90
0.000001	100	100	100	100	95
TESTIGO	100	100	100	100	100

TABLA VI. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAMPIT SOBRE EPIMASTIGOTES DE LA CEPA PARRA DE *Trypanosoma cruzi*.

CONCENTRACION (MOLAR)	TIEMPO (MINUTOS)				
	0	30	60	90	120
SOBREVIVENCIA (%)					
0.1	100	50	40	30	25
0.01	100	66	50	40	30
0.001	100	78	66	55	45
0.0001	100	80	70	65	60
0.00001	100	88	85	80	70
0.000001	100	95	95	90	90
TESTIGO	100	100	100	100	100

TABLA VII. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAMPIT SOBRE EPIMASTIGOTES DE LA CEPA VILLA DE *Trypanosoma cruzi*.

CONCENTRACION (MOLAR)	TIEMPO (MINUTOS)				
	0	30	60	90	120
SOBREVIVENCIA (%)					
0.1	100	85	80	75	60
0.01	100	90	85	75	65
0.001	100	90	90	80	70
0.0001	100	95	95	85	80
0.00001	100	100	95	95	85
0.000001	100	100	100	95	90
TESTIGO	100	100	100	100	100

TABLA VIII. EVALUACION *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD DEL LAMPIT SOBRE LAS CEPAS COMPOSTELA, PARRA y VILLA DE *Trypanosoma cruzi*.

CONCENTRACION (MOLAR)	REDUCCION DE LA POBLACION (%)		
	COMPOSTELA	PARRA	VILLA
0.1	65	25	60
0.01	75	30	65
0.001	80	45	70
0.0001	80	60	80
0.00001	90	70	85
0.000001	95	90	90
TESTIGO	100	100	100

TABLA IX. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE RADANIL SOBRE EPIMASTIGOTES DE LA CEPA COMPOSTELA DE *Trypanosoma cruzi*.

CONCENTRACION (MOLAR)	TIEMPO (MINUTOS)				
	0	30	60	90	120
SOBREVIVENCIA (%)					
0.1	100	85	80	75	55
0.01	100	85	80	80	65
0.001	100	85	85	80	75
0.0001	100	95	90	85	80
0.00001	100	100	95	90	90
0.000001	100	100	100	90	90
TESTIGO	100	100	100	100	100

TABLA X. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE RADANIL SOBRE EPIMASTIGOTES DE LA CEPA PARRA DE *Trypanosoma cruzi*.

CONCENTRACION (MOLAR)	TIEMPO (MINUTOS)				
	0	30	60	90	120
SOBREVIVENCIA (%)					
0.1	100	66	50	40	35
0.01	100	70	60	50	45
0.001	100	80	70	60	60
0.0001	100	90	90	80	80
0.00001	100	95	95	95	90
0.000001	100	100	100	95	90
TESTIGO	100	100	100	100	100

TABLA XI. EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE RADANIL SOBRE EPIMASTIGOTES DE LA CEPA VILLA DE *Trypanosoma cruzi*

CONCENTRACION (MOLAR)	TIEMPO (MINUTOS)				
	0	30	60	90	120
	SOBREVIVENCIA (%)				
0.1	100	75	75	65	60
0.01	100	80	75	75	65
0.001	100	80	85	80	70
0.0001	100	85	85	80	80
0.00001	100	95	85	85	80
0.000001	100	100	90	85	85
TESTIGO	100	100	100	100	100

TABLA XII. EVALUACION *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD DEL RADANIL SOBRE LAS CEPAS COMPOSTELA, PARRA y VILLA DE *Trypanosoma cruzi*.

CONCENTRACION (MOLAR)	REDUCCION DE LA POBLACION (%)		
	COMPOSTELA	PARRA	VILLA
0.1	55	40	60
0.01	65	45	65
0.001	75	60	70
0.0001	80	80	80
0.00001	90	95	80
0.000001	90	100	85
TESTIGO	100	100	100

TABLA XIII. EVALUACION IN VIVO DE LA ACTIVIDAD DEL GOSIPOL, LAMPIT Y RADANIL A UNA DOSIS DE 500 mg/Kg SOBRE LA PARASITEMIA ORIGINADA POR LA CEPA COMPOSTELA.

TIEMPO (hrs)	0	2	4	6	8
GOSIPOL	100	95	92	90	80
TESTIGO	100	100	100	100	100
LAMPIT	100	98	95	94	95
TESTIGO	100	100	100	100	100
RADANIL	100	80	75	70	70
TESTIGO	100	100	100	100	100

Porcentaje de sobrevivencia

Gráfica I. Evaluación in vivo de la actividad del Gosipol, Lampit y Radanil sobre la parasitemia originada por la cepa Compostela de *T. cruzi*.

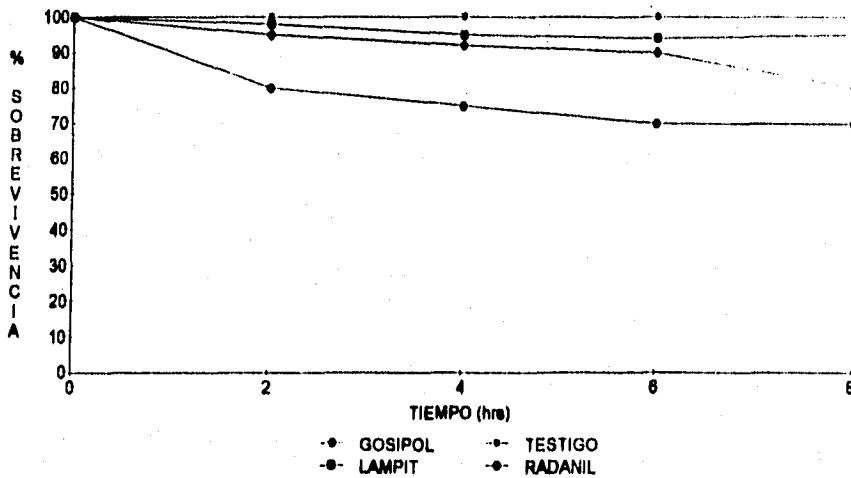


TABLA XIV. EVALUACION *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD DEL GOSIPOL, LAMPIT Y RADANIL A UNA DOSIS DE 500 mg/Kg SOBRE LA PARASITEMIA ORIGINADA POR LA CEPA PARRA.

TIEMPO (hrs)	0	2	4	6	8
GOSIPOL	100	90	80	75	45
TESTIGO	100	100	100	100	100
LAMPIT	100	75	50	43	70
TESTIGO	100	100	100	100	100
RADANIL	100	65	45	38	30
TESTIGO	100	100	100	100	100

Porcentaje de sobrevivencia

Gráfica II. Evaluación *in vivo* de la actividad del Gosipol, Lampit y Radanil sobre la parasitemia originada por la cepa Parra de *T. cruzi*.

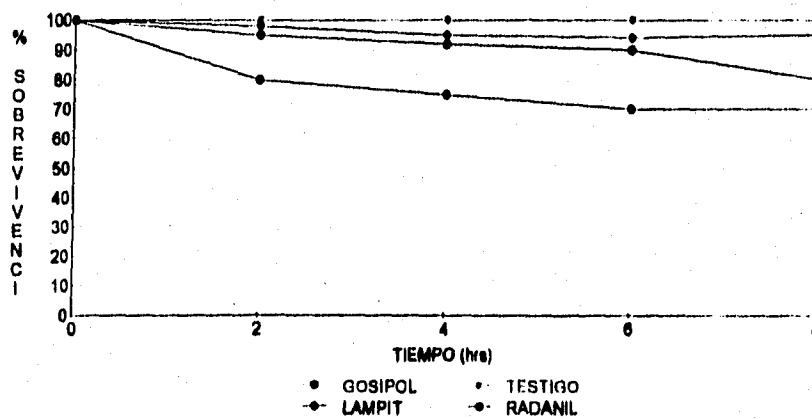
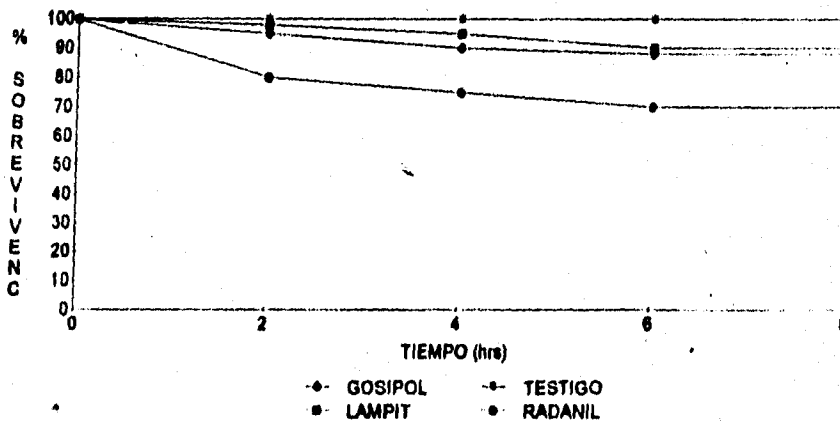


TABLA XV. EVALUACION IN VIVO DE LA ACTIVIDAD DEL GOSIPOL, LAMPIT Y RADANIL A UNA DOSIS DE 500 mg/Kg SOBRE LA PARASITEMIA ORIGINADA POR LA CEPVA VILLA.

TIEMPO (hrs)	0	2	4	6	8
GOSIPOL	100	95	90	88	88
TESTIGO	100	100	100	100	100
LAMPIT	100	98	95	90	90
TESTIGO	100	100	100	100	100
RADANIL	100	80	75	70	70
TESTIGO	100	100	100	100	100

Porcentaje de sobrevivencia

Gráfica III. Evaluación in vivo de la actividad del Gosipol, Lampit y Radanil sobre la parasitemia originada por la cepa Villa de *T. cruzi*.



**FALTA PAGINA**

**No. 45**



#### 4.2 Discusión

Las cepas COMPOSTELA, PARRA y VILLA de *Trypanosoma cruzi*, se emplearon para las determinaciones *in vitro* e *in vivo* de la actividad de tres fármacos; así mismo se comparó esta actividad mediante la evaluación de la susceptibilidad y/o resistencia de cada cepa al fármaco.

Los métodos utilizados para las determinaciones fueron:

- e) *in vitro*, método propuesto por Blanco (descrito en Metodología).

Los compuestos seleccionados para establecer la comparación de actividad fueron el Gosipol, Lampit y Radanil, los cuales presentaron actividades farmacológicas importantes, aunque no eliminan por completo a los epimastigotes de las tres cepas de *T. cruzi* aún a concentraciones elevadas (500 mg/Kg). El Gosipol presentó una mejor actividad que el Lampit y el Radanil, probablemente debido a que el primero por ser menos polar (no se disuelve en agua), tiene mucho más afinidad por las membranas y las atraviesa fácilmente interactuando así con la  $\alpha$ -hidroxiácido oxidoreductasa inhibiendo el metabolismo energético, con lo que se afecta la motilidad y la sobrevivencia del parásito. La cepa COMPOSTELA muestra a su vez una mayor resistencia al Gosipol y al Lampit, no así al Radanil, en el que la cepa VILLA presenta la mayor resistencia. La cepa PARRA, mostró la mayor susceptibilidad a los tres fármacos.

Las pruebas *in vitro* demuestran que al incrementarse la concentración de los fármacos, el porcentaje de reducción de la población de las cepas aumentó durante los 120 minutos de la prueba.

b) In vivo, método propuesto por Briner (descrito en Metodología)

Este método permite determinar en un plazo corto la sensibilidad y/o resistencia de las formas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* a los fármacos, mostrando de manera más real la eficiencia de éstos contra el parásito al ser el tratamiento semejante a las condiciones presentadas en el ser humano. Las pruebas in vivo se llevaron a cabo a partir del día 20 evo., elegido como el de máxima parasitemia en base a un análisis de gráficas obtenidas del comportamiento de las cepas ensayadas en el Laboratorio de Entomología. Los fármacos a evaluar se administraron por vía oral evitando en lo posible el estrés a los animales por exceso de manipulación, se debe observar mayor cuidado en la introducción de la aguja (despuntada), en la garganta del animal, ya que de este hecho depende la aplicación correcta de la dosis estipulada.

La evaluación de la actividad de los fármacos en las pruebas in vivo muestran que la cepa COMPOSTELA presenta mayor resistencia a éstos al igual que en las pruebas in vitro, ya que a las 8 horas la sobrevivencia del parásito disminuyó. De igual manera la cepa PARRA es más susceptible a la actividad de los fármacos, principalmente al Radanil, con el que la sobrevivencia de los parásitos a las 8 horas disminuyó en un 70%.

## CAPITULO V

ESTA TESIS DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## CONCLUSIONES

### 5.1 Conclusiones.

1. El estudio de tres cepas de *Trypanosoma cruzi* (PARRA, VILLA y COMPOSTELA), mostró la heterogeneidad de las poblaciones del parásito en cuanto a la susceptibilidad a los fármacos comunmente empleados en el tratamiento de la enfermedad que ocasiona.
2. La cepa PARRA mostró la mayor susceptibilidad a los fármacos elegidos (Gosipol, Lampit y Radanil) en las pruebas *in vitro*, como en las *in vivo*.
3. En las pruebas *in vitro*, el Gosipol presentó un buen efecto tripanomicida en las tres cepas, mucho mejor que el Lampit y el Radanil. En tanto su efecto tripanomicida en las pruebas *in vivo*, fue un poco menos pronunciado.
4. En las pruebas *in vivo*, el Radanil mostró un efecto tripanomicida poco mejor que el Gosipol y mucho mejor que el Lampit.
5. La administración del fármaco específico en pacientes con enfermedad de Chagas, se basa en el aislamiento del parásito, su caracterización y en la evaluación de los fármacos, aumentando así las propabilidades de una cura parasitológica.

- Brener, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 4: 389-396. 1962.
- Brener, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Rev. Microbiology. 27, 347-382. 1973.
- Brener, Z., Leny, S. y Filardi, J. A rapid method for testing in vivo the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 79(2): 221-225. 1984.
- Brener, Z. General review on *T. cruzi*. Classification and taxonomy. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18, 1-8. 1985.
- Burgos, C., C. E. Coronel, N. M. Gerez de Burgos, y A. Blanco. Studies in vitro on shuttle system of mouse spermatozoa. Biochem. J. 208: 413-417. 1982.
- Cameron, S. M., Waller, D. P. y Zaneveld, L.J.D. Vaginal spermicidal activity of gossypol in the *Macaca arctoides*. Fer. Steril. 37: 273-274. 1982.
- Cazzulo, J. J. Protein and aminoacid catabolism in *T. cruzi*. Comp. Biochem. Physiol. 79(B): 309-320. 1984.

Cazzulo, J. J. Energy metabolism in *T. cruzi* in subcellular biochemistry. Vol. 18: Intracellular Parasites. J.L. A vila y J. R. Harris. Plenum Press. New York. - pp. 235-257. 1992.

Chavala, J. C., Waits, U. B., Ikeler, T., Pachett, A. A. Payne, L., Peterson, R.H., Reamer, R.A. y Fisher, M.H. 1-(substituted)benzyl- 5 - aminoimidazole - 4 - carboxamides are potent orally active inhibitors of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Experimentia* 47: 51-53. 1991.

De Souza, W. Cell biology of *T. cruzi*. *Int. Rev. Cytol.* 86: 197-283. 1984.

Docampo, R. & De Boiso, J. J., and Stoppani, A. O. M. Tri-carboxilic acid cycle operation at the kinetoplast mitochondrion complex of *T. cruzi*. *Biochem. Biophys. Acta*; 502(3): 466-476. 1978.

Gutteridge, W. E. *T. cruzi*: Recent biochemical advances. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75: 484-492. 1969.

Gutteridge, W. E., Knowler, J. S. y Coombes, J.D. Chemotherapy of *T. cruzi* *J. Protozoology* 16: 521-525. 1969.

Hoare, A. C. y Wallace, F. Developmental stages of Trypanosoma  
tid Flagellates. A new terminology. Nature 218 ,  
1385-1386. 1966.

Lee, C. Y. y Malling, H. Y. Selective inhibition of sperm-  
specific lactate dehydrogenase X by the antifertility a  
gent, goesypol. Fedn. Proc. Am. Soc. Exp. Biol. 40:  
718. 1981.

Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain  
J., Hanigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich III, A.  
R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.V., Pol  
jansky, G., Sprague V., Varra, J. y Wallace, F. G. A new  
ly revised classification of the protozoa. J. Protozool.  
27(1): 37-58. 1980.

Montamat, E. E., Burgos, C., Gerez de Burgos, N., Rovai, L., -  
Bianco A. y Segura, E. L. Inhibitory action of gossypol  
on enzymes and growth of T. cruzi. Science, 218: 288-289.  
1982.

Morello, A. The Biochemistry of the mode of action of drugs  
and the detoxication mechanism in Trypanosoma cruzi. Re  
views of infectious disease 6(2): 223-238. 1988.

Moreno, R. y Moreno, S.N.J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic on *T. cruzi*. *Reviews of infectious diseases* 6(2) 223-238. 1984.

Noguera, T. B., Baez, R. I., y Wong, C. Orientación actual de la Quimioterapia de la enfermedad de Chagas en México. *Acta Médica* 27(105-106): 37-56. 1991.

Poso, H., Wichmann, K., Janne, J. and Luukkainen, T. Gossypol: a powerful inhibitor of human spermatozoal metabolism. *Lancet*. 1: 885-886. 1980.

Schmidt, D. G. & Roberts, S. L. *Fundamentos de Parasitología*. Compañía Editorial Continental, S. A. pp 63-66. 1984.

Schofield, J. C. Eradication of Chagas' disease: A new regional programme for southern Latin American. *Ann. Soc. - Belg. Med. Trop.* 72(Suppl. 1): 69-70. 1992.

Soberón y P. G. y Peláez, F. D. *NoCIONES de parasitología y patología tropical*. Editor, Francisco Méndez Oteo, México. p. 92-99. 1977.



Stoppani, A. Bioquímica de Trypanosoma cruzi. Intersciencia 8(6). 1983.

Turrens, J. F. The potential of Antispermatic drugs against Trypanosomatidae. Parasitology Today. Vol II, No. 12, pp. 351-352. 1986.

Velasco, C. O. & Guzman, B. C. Importancia de la enfermedad de Chagas en México. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 28: 275-283. 1986.

World Health Organization. Chagas' disease. UNDP/World Bank/ W.H.O. Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR). VI Programme Reports 1-7, 1-12. 1982.

World Health Organization. Control of Chagas' disease. Geneva, W.H.O. Technical Report No. 811. pp. 95 1991.

**BIBLIOGRAFIA**

Avila, J.L. Chagas disease. Sixth program report. TDR/PR-6/  
UNADP/WORLD BANK/ WHO. 1983.

Bergmeyer, U.H. METHODS OF ENZYMATIC ANALYSIS. Academic Press,  
N.Y. and London. p. 736, 743, (1965).

Blagi, F. Enfermedades Parasitarias. La Prensa Medica Mexicana.  
2a. Edicion, pp. 139-147. 1980.

Blanco, A. Burgos, C., Gerez de Burgos, N. M., y Montamat, E.F.  
Properties of the testicular lactate dehydrogenase isoen-  
zyme. Bichem. J. 153: 165-172. 1976.

Blanco, A., y Zinkham, W.H. Lactate dehydrogenase in human tes-  
tes. Science. 139: 601-602. 1963.

Blanco, A., Aoki, A. Montamat, E. y Roval, L. Effect of go-  
ssypol upon motility and ultraestructure of T. cruzi. J,  
Protozool. 30(4): 648-651. 1983.

Blanco, A. On the functional significance of LDH-X. Johns -  
Hopkins, Med. J. 146: 231-235. 1980.