



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**POTENCIACIÓN DE DROGAS ANTICHAGÁSICAS.
ESTUDIO EN CÉLULAS VERO Y RATONES INFECTADOS CON
*Trypanosoma cruzi***

CLAUDIA PAMELA SEGUEL OLIVARES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: JUAN DIEGO MAYA ARANGO MD. MSc. PhD

Financiamiento Proyecto FONDECYT 1020095

**SANTIAGO, CHILE
2005**



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**POTENCIACIÓN DE DROGAS ANTICHAGÁSICAS.
ESTUDIO EN CÉLULAS VERO Y RATONES INFECTADOS CON
*Trypanosoma cruzi***

CLAUDIA PAMELA SEGUEL OLIVARES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : JUAN DIEGO MAYA ARANGO
PROFESOR CONSEJERO : CLAUDIO ZÚÑIGA MARTI
PROFESOR CONSEJERO : FERNANDO FREDES MARTINEZ

Financiamiento Proyecto FONDECYT 1020095

**SANTIAGO, CHILE
2005**

Dedicatoria

"La grandeza de una nación y su progreso moral puede ser juzgado por la forma en que sus animales son tratados"

Gandhi

A veces es difícil comenzar, pero más difícil es continuar y llegar al final de un propósito importante en tu vida. Las adversidades nunca faltan, pero la fuerza siempre está en el interior para llevar a cabo tus sueños y disfrutar finalmente tus logros...

A mi madre por su apoyo incondicional...

A mi dulce amor por simplemente ser eso y mucho más, mi amor...

A mis hermanos menores, animales para algunos, amigos incondicionales para otros...

Agradecimientos

Cuando el sol cubre la tierra para darle la bienvenida al nuevo día, mis guías y maestros ya han recorrido un largo camino... es por eso y por mucho más que les agradezco.

Energía galopante, llena de sabiduría, impregna cada día al maestro. Su dedicación y paciencia no tuvo límite para mi enseñanza. Gracias doctor Juan Diego Maya por dirigir esta tesis y guiar mi trabajo con agrado y amistad.

Aventurero empedernido, colmado de relatos sabios y divertidos. Siempre me apoyó y enseñó con alegría sus conocimientos. Gracias doctor Antonio Morello por sus risas, bromas y enseñanzas a flor de piel.

Dulzura, ternura y sabiduría se reflejan en ella, maestra incondicional, consejera y amiga. Gracias doctora Yolanda Repetto, por apoyar mi trabajo.

Estos son los maestros, personas invaluable, llenas de cariño para sus estudiantes, siempre dispuestas a enseñar y comprender. Gracias por confiar en mi trabajo y permitirme ser parte de su equipo.

Seres mitológicos quedan pequeños al lado de mis nuevos amigos. Personas llenas de risas y encanto, sin dejar de lado su enorme sabiduría, me apoyaron en el desarrollo de mi tesis y llegaron a ser parte importante en mi vida. Gracias Mario y Lupin por ser mis amigos y compañeros, jamás olvidaré esos días de experimentos y risas.

Luz llena de conocimiento, me acompañó desde los inicios de mi trabajo. Gracias Carla por enseñarme y llegar a ser una muy buena amiga.

Personajes infaltables, con una sonrisa en el rostro, siempre estuvieron dispuestos a ayudar y apoyar mi trabajo. Enrique y Charly, gracias por entregar parte de su tiempo en el desarrollo de mi tesis.

Debo agradecer además a Alejandro García y a don José Meneses, por apoyar mi trabajo en los estudios in vivo de mi tesis.

Como olvidar al doctor Claudio Zúñiga y al doctor Fernando Fredes, siempre dispuestos a ayudar y aclarar mis dudas.

Finalmente agradezco a mis seres queridos, quienes me apoyaron en el desarrollo de mi tesis y me acompañaron durante mi carrera. Gracias a Margarita y Guillermo, mis padres; Margot y Alejandro; mis padres en Santiago; Paola, Camila, Paz y Alejandra, mis hermanas; Marco, mi dulce amor y a todas esas mascotas que han compartido mi vida estudiantil.

Gracias a la vida, por darme la oportunidad de llegar a ser Médico Veterinario, personaje importante en la salud animal y humana.

Al proyecto FONDECYT 1020095 por financiar esta tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE CUADROS	viii
RESUMEN	ix
SUMMARY	x
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
Antecedentes históricos de la Enfermedad de Chagas	3
Ciclo biológico del <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Epidemiología	6
Aspectos clínicos de la Enfermedad de Chagas	7
Tratamiento de la Enfermedad de Chagas	8
Mecanismo de acción de Nifurtimox y Benznidazol	9
Metabolismo de tioles y defensa contra radicales libres	11
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Parásitos	17
Células VERO	17
Índice endocítico	18
Determinación de proteínas totales	18
Ratones	19

Modelo de infección	19
Administración de drogas	19
Estudio de parasitemias	20
Análisis estadísticos	20
RESULTADOS	21
Resultados <i>in vitro</i>	21
Resultados <i>in vivo</i>	29
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
FIGURA 2. - Reducción de Nitrocompuestos	10
FIGURA 3.- Síntesis de tioles en <i>Trypanosoma cruzi</i> .	14
FIGURA 4.- Microfotografía del efecto de nifurtimox sobre células VERO infectadas con la cepa MF de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
FIGURA 5.- Efecto de nifurtimox, benznidazol y su asociación a BSO 25 μ M, en células VERO infectadas con la cepa MF de <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
FIGURA 6.- Efecto de nifurtimox, benznidazol y su asociación a BSO 25 μ M, en células VERO infectadas con la cepa LQ de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
FIGURA 7.- Efecto de nifurtimox, benznidazol y su asociación a BSO 25 μ M, en células VERO infectadas con la cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
FIGURA 8.- Efecto de nifurtimox, benznidazol y su asociación a BSO 25 μ M, en células VERO infectadas con la cepa clon Dm28c de <i>Trypanosoma cruzi</i> ,	27
FIGURA 9.- Parasitemia de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Grupo Control versus BSO	30
FIGURA 10.- Sobrevida de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Grupo Control versus BSO	31
FIGURA 11.- Parasitemia de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Grupo Control versus nifurtimox	32

FIGURA 12.- Sobrevida de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Grupo Control versus nifurtimox	33
FIGURA 13.- Parasitemia de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Grupo Control versus benznidazol.	34
FIGURA 14.- Sobrevida de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Grupo Control versus benznidazol	35
FIGURA 15.- Parasitemia de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Grupo Control versus BSO asociado a nifurtimox	36
FIGURA 16.- Sobrevida de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Grupo Control versus BSO asociado a nifurtimox	37
FIGURA 17.- Parasitemia de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Grupo Control versus BSO asociado a benznidazol	38
FIGURA 18.- Sobrevida de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Grupo Control versus BSO asociado a benznidazol	39

INDICE DE CUADROS

- CUADRO 1.-** Valores IC_{50} para nifurtimox y su asociación con BSO, en células VERO infectadas con distintas cepas de *Trypanosoma cruzi* **28**
- CUADRO 2.-** Valores IC_{50} para benznidazol y su asociación con BSO, en células VERO infectadas con distintas cepas de *Trypanosoma cruzi* **28**

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, que presenta tres estados morfológicos en su ciclo biológico: amastigote, tripomastigote y epimastigote. Aproximadamente 25 millones de personas en América latina, son afectadas por este parásito.

El tratamiento clínico actual se hace con las drogas antichagásicas nifurtimox y benznidazol, que actúan mediante la formación de radicales libres y/o intermediarios electrofílicos durante su metabolismo. Al respecto, el glutatión (GSH) y derivado bis-glutationil-espermidina (tripanotión, T(SH)₂) son los principales agentes antiradicalarios con los que cuenta el parásito. Previamente se ha reportado que la susceptibilidad del *T. cruzi* a la acción de ambas drogas depende del contenido de glutatión libre y conjugado.

L-Butionina (S, R) Sulfoximina (BSO) es un inhibidor de la enzima γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS), etapa limitante en la síntesis de glutatión y por tanto puede hacer más susceptible al parásito al efecto de nifurtimox y benznidazol. En esta Memoria se estudió el efecto de nifurtimox y benznidazol con o sin BSO, en un modelo *in vitro* de infección con *T. cruzi* usando células VERO como hospedero. En este modelo, BSO 25 μ M disminuyó el IC₅₀ de nifurtimox y benznidazol (concentración necesaria para disminuir en un 50% el número de amastigotes por cien células VERO o índice endocítico) en cerca del 60%. Estos resultados indican que BSO es capaz de aumentar el efecto tripanocida de las drogas antichagásicas nifurtimox y benznidazol, sobre la forma amastigota de *T. cruzi*, en todas las cepas estudiadas.

Por otra parte, también se estudió el efecto de nifurtimox y benznidazol y su asociación con BSO en un modelo *in vivo*. Los resultados indican que al usar sólo BSO se obtiene un 100% de supervivencia de los ratones infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi* y además, disminuye las parasitemias a niveles indetectables más rápidamente de lo que ocurre en el grupo control.

Actualmente no se han desarrollado drogas más efectivas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Este estudio sugiere que el uso de BSO en combinación con nifurtimox o benznidazol podría disminuir las dosis clínicas de ambas drogas para obtener resultados similares, o bien acortar la duración del tratamiento, incidiendo posiblemente en una menor tasa de aparición de RAM producidas por estos fármacos.

SUMMARY

ANTICHAGASIC DRUGS POTENTIATION. STUDIES UPON VERO CELLS AND *Trypanosoma cruzi* INFECTED MICE

Chagas disease is produced by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. The life cycle of the parasite includes three morphological stages: amastigote, trypomastigote and epimastigote. Approximately 25 million people in Latin America are affected by this parasite.

At present, Nifurtimox and Benznidazole are the antichagasic drugs used in the clinical practice. They act through free radicals and electrophilic compounds formation during their metabolism. Glutathione (GSH) and its bis-glutathionyl-spermidine derivative (trypanothione (T(SH)₂)) are the main free radical and electrophilic scavenger compounds in the parasite. *T. cruzi* susceptibility depends at least partially on free and conjugated glutathione.

Buthionine sulfoximine is a potent inhibitor of γ -glutamyl cysteine synthetase (step-limiting enzyme of glutathione synthesis). This Memory studies the effect of nifurtimox and benznidazol, with and without BSO, upon an in vitro model of *T. cruzi* infection, using VERO cells as host. In this model, 25 μ M BSO lowered by approximately 60% the IC₅₀ of nifurtimox and benznidazole (concentration needed to lower by 50% the number of intracellular amastigotes per hundred VERO cells or endocytic index). These results indicate that BSO increase tripanocidal action of the antichagasic drugs nifurtimox and benznidazole in amastigotes in all *T. cruzi* strains studies

An *in vivo* model was also used to study the action of the association of nifurtimox and benznidazole with BSO. Results showed that BSO alone produced 100% survival of the *T. cruzi* infected mice and lowered parasitemia to near zero faster than in controls.

Currently, there are no new or more effective antichagasic drugs than nifurtimox and benznidazole. This thesis suggest that BSO in combination with nifurtimox or benznidazol might lower their dose or shorten treatment length, in both situations, the adverse event probability could be lowered.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es después de la malaria, la infección parasitaria más importante de América Latina, afectando aproximadamente a 25 millones de personas (WHO, 2002).

Su agente etiológico es el *Trypanosoma cruzi*, un protozoo flagelado que involucra en su ciclo de vida a insectos vectores y hospederos mamíferos. En Chile, uno de los vectores domiciliarios es *Triatoma infestans*, llamado comúnmente “vinchuca”, habita viviendas de adobe y de precaria construcción. Los triatominos se infectan al ingerir sangre de mamíferos que contienen tripomastigotos. En el intestino medio del triatomo, los parásitos se multiplican por fisión binaria como epimastigotos y al cabo de quince a treinta días se desarrollan los tripomastigotos en el intestino posterior del insecto. Cuando el insecto infectado pica al mamífero, emite deyecciones con tripomastigotos metacíclicos, que atraviesan la piel por el sitio de la picadura o por las mucosas. Los tripomastigotos penetran a las células y se transforman en amastigotos, los cuales se multiplican por fisión binaria, repletan la célula hospedera que termina por romperse y salen a la circulación como tripomastigotos sanguíneos, diseminándose por todo el organismo y repiten muchas veces este ciclo. Finalmente los tripomastigotos son ingeridos por los triatomas hematófagos (Atías, 1998).

Esta enfermedad compromete órganos del sistema linforreticular, sistema nervioso central, miocardio y órganos huecos. Tiene tres fases clínicas generales; fase aguda, fase de latencia y fase crónica (Atías, 1998).

En la actualidad se dispone de las drogas antichagásicas nifurtimox (Nx) y benznidazol (Bz) para el tratamiento clínico. Su mecanismo de acción está dado por la producción de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos. Dado que los mecanismos antioxidantes de *T. cruzi* son deficientes respecto a la célula del mamífero, el glutatión reducido (GSH) y el tripanotión, (T(SH)₂) son los principales agentes con que cuenta el parásito, contra los radicales libres y/o metabolitos electrofílicos.

El GSH es el tiol más abundante en las células de mamíferos y se le ha encontrado en casi todos los seres vivos (Sies, 1999). La enzima γ -glutamyl-cisteinil sintetasa (γ -GCS) inicia la síntesis de GSH y puede ser inhibida por L-butionina [S,R] sulfoximina (BSO), la cual presenta alta especificidad por la enzima. BSO se une fuertemente, pero en forma no covalente, al sitio activo de la enzima. Se ha observado que en varias cepas de *T. cruzi*, cuando son tratados con BSO, la concentración de GSH disminuye en un 50%, potenciando la toxicidad de nifurtimox y benznidazol (Moncada *et al.*, 1989; Repetto *et al.*, 1996). Esta observación puede ser explicada, porque el *T. cruzi* tiene niveles de GSH libre y conjugado mucho más bajos que los niveles de GSH de los hospederos mamíferos (Moncada *et al.*, 1989; Morello *et al.*, 1994; Repetto *et al.*, 1996; Maya *et al.*, 1997; Stoppani, 1999), lo cual constituye una importante diferencia bioquímica y potencial blanco terapéutico.

La administración de BSO en ratones a dosis de 4 mmoles/Kg bloquea la síntesis de GSH prácticamente en todos los tejidos (Griffith y Meister, 1979). Cuando esta disminución en la concentración de GSH se estudió en tejido neoplásico, se observó que la velocidad de recuperación de los niveles de GSH era inferior en los tumores que en el tejido normal. Esto evidenció la posible utilidad de este inhibidor como agente sensibilizante de tumores a la radiación y a los agentes quimioterapéuticos. Al respecto, se relacionó la eliminación de tumores con la disminución de los niveles de GSH mediado por BSO al ser tratados con distintos agentes alquilantes y cisplatino, mostrando un mínimo aumento de las reacciones adversas clásicas mediadas por estos agentes quimioterapéuticos (Bailey *et al.*, 1994). Dado lo anterior, la disminución en el contenido de GSH en el hospedero humano podría significar algún problema terapéutico, pero aparentemente, esta estrategia no tiene consecuencias tóxicas según lo informado en experimentos en humanos (Bailey *et al.*, 1994; O'Dwyer *et al.*, 1996; Bailey *et al.*, 1997).

Basados en las consideraciones anteriores, en esta memoria estudiamos cómo nifurtimox y benznidazol y su combinación con BSO afecta la toxicidad sobre *T. cruzi* en un modelo *in vitro* e *in vivo* de la Enfermedad de Chagas. Estos estudios nos podrían proporcionar las bases de una nueva estrategia quimioterapéutica antichagásica, con menor toxicidad para el hospedero y por lo tanto mucho más efectiva.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Antecedentes Históricos de la Enfermedad de Chagas

En 1909, Carlos Chagas describió al agente etiológico de la enfermedad, un protozoo hemoflagelado, al que denominó *Trypanosoma cruzi*, en honor a su maestro, el médico sanitarista Osvaldo Cruz. Además, identificó algunos de los vectores y hospederos reservorios, y dedujo correctamente la mayor parte del ciclo de transmisión de este parásito (Chagas, 1909). Aún cuando el descubrimiento de esta parasitosis data desde comienzos del siglo pasado, existen antecedentes de que esta enfermedad esta presente desde hace mas de 9.000 años en el continente americano, pues se ha demostrado mediante amplificación por PCR de fragmentos del DNA del kinetoplasto (kDNA), la presencia de *T. cruzi* en momias encontradas en el sur del Perú y norte de Chile (Aufderheide *et al.*, 2004).

Ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*

El complejo ciclo de vida del *T. cruzi* involucra necesariamente a un hospedero mamífero y un insecto vector (triatominos hematófagos). La transmisión a mamíferos, incluido el hombre, ocurre cuando las heces del triatomino, que contienen la forma infectiva del parásito (tripomastigota), entran en contacto con la piel, ingresando a través de la picadura o por las mucosas del mamífero, como por ejemplo la conjuntiva.

Luego de atravesar la dermis del hospedero mamífero, el *T. cruzi* infecta primeramente a los macrófagos, aunque puede infectar cualquier tipo de célula nucleada. Tras varios ciclos de división de la forma amastigota dentro de los macrófagos, se liberan a la circulación nuevas formas infectantes (tripomastigotes sanguíneos) por ruptura la célula hospedera, la cual muere. Ahora estos parásitos son capaces de infectar otras células del organismo, en lugares distantes de la primera infección. Para continuar el ciclo, un triatomino hematófago debe alimentarse de sangre que contiene la forma tripomastigota de *T. cruzi*. En el intestino medio del vector, los parásitos se transforman a la forma epimastigota, capaz de multiplicarse por fisión binaria en esta zona del intestino del triatomino. Al cabo de quince a treinta días, los epimastigotes pasan

al intestino posterior del insecto, donde se convierten en tripomastigotes, que de nuevo serán eliminados junto con las heces del triatomino y así comenzar un nuevo ciclo (figura 1).

Lo anterior implica cambios morfológicos y fisiológicos en el parásito para adaptarse a las diferentes condiciones de los hospederos, ya sea en la célula, en sangre del mamífero, o en el intestino del triatomino (Molyneux y Ashford, 1983).

El ciclo biológico del parásito incluye tres estados morfológicos que se caracterizan por las posiciones relativas del flagelo, kinetoplasto y núcleo (Atías, 1998).

- ♦ **Tripomastigote:** Mide 20 micrones de largo, es fusiforme y la posición del kinetoplasto es subterminal. Constituyen la forma infectante y se encuentran en la sangre de los mamíferos y en el intestino posterior de los triatominos. Carece de la capacidad de multiplicarse y en los mamíferos es el diseminador de la infección por vía sanguínea (Atías, 1998) (figura 1).
- ♦ **Epimastigote:** Mide 20 micrones de largo, es fusiforme y la posición del kinetoplasto es anterior al núcleo. Representa la forma multiplicativa del parásito en el intestino del triatomino y es predominante en los medios de cultivo axénicos, por lo cual la mayoría de los estudios bioquímicos se han realizado usando este estado (Morello *et al.*, 1987; Atías, 1998) (figura 1).
- ♦ **Amastigote:** Mide aproximadamente 2 micrones de diámetro, redondeado y de flagelo no emergente. Se multiplica por fisión binaria al interior de células nucleadas del hospedero mamífero, produciendo la ruptura de éstas, liberando tripomastigotes a la sangre, los cuales infectarán nuevamente a otras células (Atías, 1998). Estos pueden ser cultivados en diferentes células como macrófagos, fibroblastos y células musculares (Morello *et al.*, 1987) (figura 1).

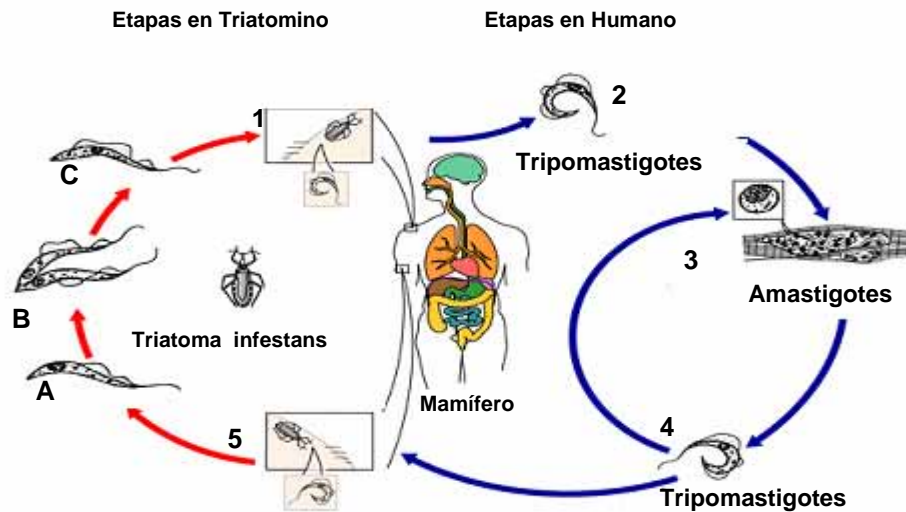


Figura 1.- Ciclo biológico de *Tripanosoma cruzi*. 1.- El insecto vector portador de *T. cruzi*, luego de alimentarse de la sangre del mamífero, deyecta liberando tripomastigotes metacíclicos, los cuales atraviesan la dermis por el sitio de la picadura o por las mucosas. 2.- En el mamífero los tripomastigotes invaden las células nucleadas (primeramente macrófagos), para luego diferenciarse en amastigotes. 3.- Los amastigotes se multiplican por fisión binaria en el interior de células nucleadas hasta repletarla y salir de ella bajo la forma tripomastigota. 4.- Los tripomastigotes salen a la circulación sanguínea e infectan otros tejidos. 5.- El ciclo termina cuando un nuevo vector se alimenta de sangre que contiene tripomastigotes. A.- En el intestino del triatomino el tripomastigote se diferencia a epimastigote. B.- El epimastigote se multiplica por fisión binaria en el intestino medio del insecto vector. C.- En el intestino posterior del triatomino los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, los cuales son eliminados con las deyecciones del vector, al alimentarse con la sangre de un nuevo hospedero mamífero.

Esta zoonosis parasitaria además de la transmisión vectorial, puede ser transmitida a través de transfusiones sanguíneas desde pacientes infectados. En forma ocasional, puede existir una transmisión de la madre al feto, resultando en un aborto espontáneo o en enfermedad de Chagas congénita, situación que puede llegar del 2 al 5 % de recién nacidos de madres infectadas (Lorca, 1987). Finalmente, este parásito se puede transmitir accidentalmente en laboratorios de investigación, pero su incidencia es prácticamente nula (Kirchhoff, 1993).

Epidemiología

En América Latina, la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es endémica y es, después de la malaria, la enfermedad ligada a vectores de mayor prevalencia y mortalidad (Atías, 1998; Moncayo, 1993; WHO 2002; Rodrigues-Coura *et al.*, 2002).

Se considera que existen al menos 100 millones de personas expuestas al riesgo de la infección (25% de la población latinoamericana) (WHO, 2002), estimándose un total de 24,7 millones de casos, cifras con las que Chile contribuye con aproximadamente 150.000 casos presumiblemente infectados (Hayes y Schofield, 1990; Atías, 1998; Moncayo, 1993; WHO, 2002). Por otro lado, las tasas de mortalidad varían entre 8 y 12 % dependiendo del país estudiado, de la edad, del estado fisiológico de los pacientes y de la modalidad del tratamiento recibido (WHO, 2002).

El riesgo de contraer la enfermedad se relaciona en forma directa con la pobreza, pues los insectos triatomíneos hematófagos encuentran un hábitat favorable en grietas, paredes sin recubrimiento y tejados de viviendas campesinas pobres, de las áreas rurales y barrios urbanos periféricos. Los movimientos migracionales hacia las zonas urbanas que ocurrieron en América Latina entre los años 1970 y 1980 cambiaron el modelo epidemiológico tradicional de la enfermedad de Chagas y la transformaron en una infección urbana que puede transmitirse por transfusión sanguínea (WHO, 2002).

Los principales vectores involucrados en la infección por *T. cruzi* son *Triatoma infestans* (Chile, Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú y Uruguay), *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius pallescens* (Colombia, Venezuela y Centro América), *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis* (Brasil). En Chile se reconocen dos especies de vectores de importancia epidemiológica en la transmisión de la enfermedad, *Triatoma infestans* involucrado en el ciclo domiciliario y *Mepraia spinolai* (*Triatoma spinolai*) involucrado en el ciclo silvestre (Canals *et al.*, 1999). También se describe una nueva especie silvestre, *Mepraia gajardo* (Frías *et al.*, 1998), pero aún no se conoce su importancia epidemiológica.

Aspectos Clínicos de la de la Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas compromete órganos del sistema linforreticular, sistema nervioso central, miocardio y órganos huecos. Tiene tres fases clínicas generales; fase aguda, fase de latencia y fase crónica (Atías, 1998).

La fase aguda se puede manifestar luego de una incubación de 4 a 14 días, pero suele pasar inadvertida en la mayoría de los casos. Se caracteriza por los signos de la primoinfección: signo de Romagna-Mazza (edema bupalpebral unilateral, de color violáceo e indoloro), que se produce cuando el sitio de entrada del parásito esta cercano al ojo. También puede aparecer una lesión indurada y eritematosa en la piel, localizada en el sitio de entrada del parásito, denominado “chagoma”, que puede estar asociado a un síndrome mononucleósido, caracterizado por linfadenopatía regional, fiebre y hepato-esplenomegalia. Además, se puede observar compromiso del corazón con taquicardia, arritmias y falla cardíaca, pero es menos frecuente. También puede haber compromiso del sistema nervioso, incluyendo cambios psicológicos, convulsiones y signos neurológicos focales. El desarrollo de la fase aguda en niños puede llegar a ser de curso fatal (Atías, 1998). Las lesiones son producidas fundamentalmente por una inflamación mononuclear local producida por la ruptura de células parasitadas. Esta severa inflamación usualmente esta acompañada por necrosis de células parasitadas y no parasitadas, especialmente en el corazón. También se ha observado agregación plaquetaria, degranulación de eosinófilos, edema, trombosis, estasis sanguíneo e isquemia (Rodrigues-Coura *et al.*, 2002).

Luego de la fase aguda se puede presentar una fase de latencia caracterizada por la lenta multiplicación intracelular de los parásitos, generándose títulos altos de anticuerpos anti-*T. cruzi*, pero también se puede acompañar de una disminución en las reacciones de hipersensibilidad inmunológica y reducción de las reacciones inflamatorias (Rodrigues-Coura *et al.*, 2002).

La fase crónica aparece en forma habitual después de diez años o más de la primoinfección. Se caracteriza por el daño irreversible de algunos parénquimas, especialmente el corazón y los órganos huecos. Los pacientes con daño severo al miocardio desarrollan una dilatación cardíaca con insuficiencia cardíaca y fenómenos de tromboembolismo con riesgo de

muerte súbita por fibrilación ventricular. También se pueden generar megaformaciones de órganos huecos, como por ejemplo megaesófago y megacolon, lo que conlleva a una muerte inminente producto de las patologías asociadas a estas lesiones (Atías, 1998).

Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Las drogas actualmente utilizadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el nifurtimox (4-[(5-nitrofurfurilideno)amino]-3-metiltiomorfolino-1,1-dióxido), derivado del nitrofurano y el benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) derivado nitroimidazólico. La dosis de nifurtimox recomendada en la fase aguda de la enfermedad es de 8-10 mg/kg/día por 90 días en adultos y de 15 mg/kg/día en niños; para el benznidazol se recomienda 5 mg/kg/día por 60 - 90 días. Aunque la duración promedio de la terapia es 60 días, en casos de reactivación de la enfermedad crónica, como en pacientes inmunosuprimidos, la duración puede prolongarse hasta 5 meses o más. Sólo en infecciones accidentales, sea a través del vector, por transfusión de sangre o por contaminación en el laboratorio, la duración del tratamiento es de 10-15 días.

Nifurtimox y Benznidazol tienen acción tripanocida contra todas las formas del parásito (Stopani, 1999). Sin embargo, pueden presentar una toxicidad sistémica y efectos colaterales que van de leves a graves. Así, el nifurtimox puede producir anorexia, náuseas, vómitos, depresión o excitación nerviosa, convulsiones, vértigo, cefalea, parestesias, neuropatías periféricas y dermatitis. Por su parte, el benznidazol puede inducir náuseas, vómitos, amnesia, cefalea, polineuropatía, prurito y fiebre (Castro y Díaz de Toranzo, 1988). Se ha reportado además, que estas dos drogas producen mutagénesis y daño al DNA, por lo que hay dudas acerca del beneficio de su uso (Zahoor *et al.*, 1987; Gorla *et al.*, 1989). Sin embargo, en grandes series de pacientes tratados con estos fármacos, no se ha encontrado mayores problemas relacionados con las RAM (Apt, 1999), por lo que el riesgo es más teórico que observado. Por otro lado, también se ha reportado diferencia de susceptibilidad entre cepas para estos dos agentes, lo que introduce un elemento adicional que complica el manejo farmacológico de esta enfermedad (Filardi y Brener, 1987).

Mecanismo de acción del nifurtimox y del benznidazol

El mecanismo de acción de las drogas nifurtimox y benznidazol es a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos (figura 2). El grupo nitro de ambas drogas, por acción de nitroreductasas, requiere de seis electrones para reducirse a grupo amino, lo cual genera varios radicales libres y metabolitos electrofílicos (Moreno *et al.*, 1982). El proceso mediante el cual se forman los radicales libres se inicia por una reacción catalizada por flavoproteínas, incluyendo la NADPH-citocromo P-450 reductasa, que actúa directamente sobre el grupo nitro de las moléculas R-NO₂, produciendo un radical intermediario anión nitro (R-NO₂^{•-}) (Moreno *et al.*, 1982). Este radical intermediario entra en reciclaje redox con el oxígeno molecular produciendo una reducción parcial del oxígeno y regenerando la droga (Mason y Holtzman, 1975). El anión superóxido (O₂^{•-}) es dismutado a H₂O₂ por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Temperton *et al.*, 1998). El anión superóxido (O₂^{•-}) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), en presencia de Fe³⁺ forman el radical libre hidroxilo (OH[•]) (Reacción de Haber-Weiss). Estos radicales libres, fundamentalmente el OH[•], alteran la estructura de macromoléculas biológicas: lípidos, proteínas y DNA, por lo tanto podrían producir mutagénesis y carcinogénesis (Castro y Díaz de Toranzo, 1988; Goijman *et al.*, 1988).

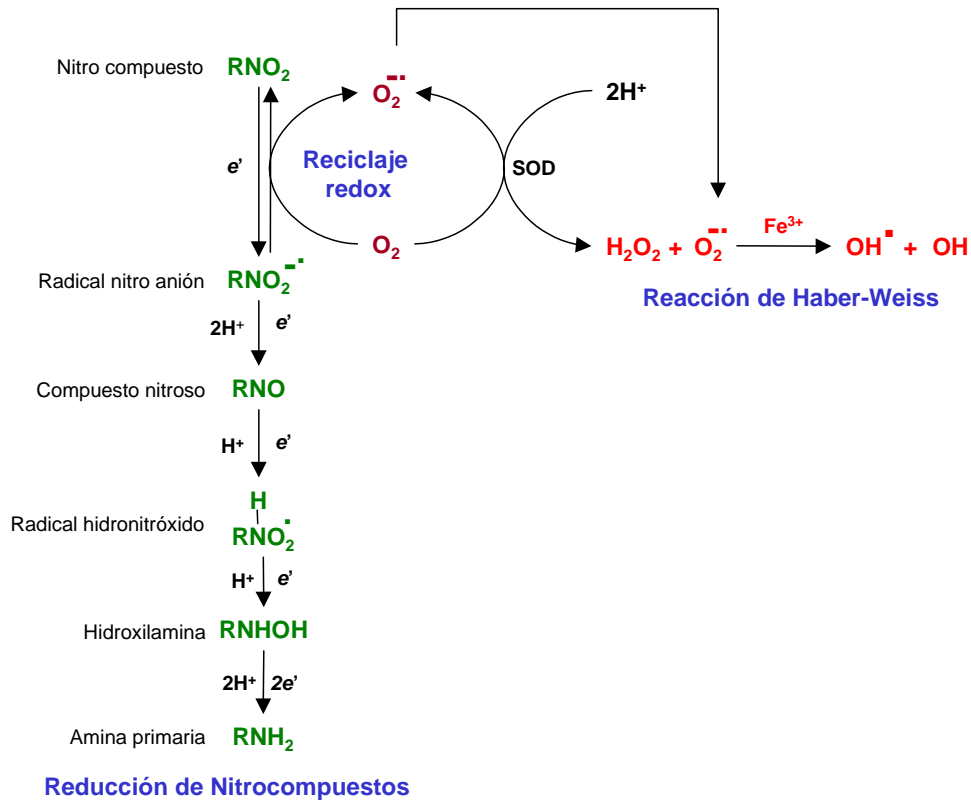


Figura 2.- Reducción de Nitrocompuestos, reciclaje redox con oxígeno y reacción de Haber-Weiss

Cuando se añade nifurtimox a cultivos de *T. cruzi*, aparece un espectro “*electron spin resonance*” (ESR) característico correspondiente al radical anión nitro (Docampo y Stoppani, 1979; Docampo *et al.*, 1981; Docampo y Moreno, 1984). Es más, la concentración de nifurtimox (10-20 μM) a la cual se inhiben los cultivos de epimastigotes es similar a la requerida para la máxima producción de anión superóxido e iniciar la salida de peróxido de hidrógeno desde la célula (Docampo y Stoppani, 1979; Moreno *et al.*, 1982. Docampo y Moreno, 1984). Estos y otros experimentos sugieren que la generación de radicales libres del oxígeno, derivados de reducción intracelular del nifurtimox, es el mecanismo de acción de esta droga contra el *T. cruzi* (Dubin *et al.*, 1983).

Al añadir benznidazol a homogenizados de *T. cruzi* conteniendo NADPH, se genera una débil señal ESR, correspondiente al radical anión nitro (Docampo y Moreno, 1984). El benznidazol inhibe el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones que no inducen la generación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . Estos resultados indican que el efecto tripanocida no depende de radicales del oxígeno, como ocurre con el nifurtimox (Moreno *et al.*, 1982). Parece probable que los metabolitos electrofílicos reducidos del benznidazol, mediante unión covalente con macromoléculas, están involucrados en sus efectos tóxicos y tripanocidas (Docampo y Stoppani, 1979; Masana *et al.*, 1984; Diaz de Toranzo *et al.*, 1988; Aldunate y Morello, 1993; Maya *et al.*, 1997). Esta hipótesis es apoyada por la reciente observación de que la generación de radicales nitro provenientes del benznidazol tiene un efecto importante sobre el proceso infectivo de los tripanosomas, mejorando la fagocitosis y aumentando la muerte del parásito (Murta *et al.*, 1999).

Existen investigaciones experimentales que demuestran una variedad de respuestas quimioterapéuticas por parte de diferentes cepas de *T. cruzi* al nifurtimox y al benznidazol (Murta *et al.*, 1998). La explicación a este fenómeno es desconocido, aunque se ha propuesto un incremento en la concentración de las enzimas de detoxificación y diferencias en el contenido de tioles intracelulares, glutatión y tripanotión, de las distintas cepas de *T. cruzi*. (Morello *et al.*, 1994; Repetto *et al.*, 1996; Maya *et al.*, 1997).

Metabolismo de tioles y defensa contra radicales libres

Las células de mamíferos poseen mecanismos de defensa antiradicalarios enzimáticos y no-enzimáticos muy eficientes (Halliwell, 1999; Gutteridge y Halliwell, 2000). Entre los enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión-S-transferasa y entre los no-enzimáticos, los compuestos reductores GSH, α -tocoferol, ácido ascórbico y β -caroteno. Sin embargo, los mecanismos de defensa del parásito frente al estrés oxidativo son deficientes (Krauth-Siegel y Coombs, 1999). No se ha detectado actividad de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa selenio dependiente (Mehlotra, 1996) y la actividad de la superóxido dismutasa se encuentra muy reducida (Ismail *et al.*, 1997; Temperton *et al.*, 1998); por otra parte, no se ha detectado la existencia de los reductores, β -caroteno y α -tocoferol, presentes en células de mamíferos. Cabe señalar además, que se ha

descrito la presencia de actividad de las enzimas ascorbato reductasa y deshidroascorbato reductasa en epimastigotes y tripomastigotes, lo cual sugiere la presencia de un ciclo redox del ácido ascórbico, semejante al de las células de mamífero (Clark *et al.*, 1994).

Dado que los mecanismos antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) del *T. cruzi* son deficientes respecto a las células de mamífero, sus principales mecanismos de defensa contra radicales libres serían el glutatión reducido y un conjugado de glutatión y espermidina denominado tripanotión. Este compuesto es característico de todos los tripanosomátidos y es indispensable para la reducción del glutatión (Krauth-Siegel y Coombs, 1999).

El glutatión (γ L-glutamyl-L-cisteinyl-glicina) es el tiol de bajo peso molecular más abundante en las células de mamíferos. Se le ha encontrado en casi todos los seres vivos (Sies, 1999) en concentraciones que fluctúan entre 0,5 y 10 μ M, dependiendo de la especie, órgano u organelo estudiados. Tiene como función, entre otras, la protección de los efectos tóxicos producidos por ciertos compuestos altamente electrofílicos como son ciertos xenobióticos, metabolitos de xenobióticos y contra los radicales libres (Sies, 1999), además de jugar un rol fundamental en la destoxicación de metales pesados, herbicidas e insecticidas (Keppler, 1999; Fu, 1999; Eaton, 2000; Pourahmad y O'Brien, 2000). Así, actúa como cofactor en reacciones catalizadas por las glutatión-S-transferasas, enzimas que conjugan GSH con una variedad de xenobióticos de carácter lipofílico-electrofílico; también juega un papel importante en la protección del DNA (Mazur, 2000) y de la membrana lipídica contra el daño producido por radicales libres (Hayes y Mclellan, 1999); actúa efectivamente como atrapador de radicales libres y participa como un cofactor del ciclo glutatión peroxidasa/glutatión reductasa; además, actuaría en forma no enzimática frente al peróxido de hidrógeno, radicales libres (Sies, 1999) y en la reacción con metales pesados y agentes electrofílicos.

La glutatión reductasa, enzima encargada de reducir el glutatión oxidado en mamíferos, tiene una actividad prácticamente irreversible con el glutatión oxidado manteniendo la razón GSH/GSSG muy alta. A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, en *T. cruzi* la reducción de GSSG se efectúa por intermedio del tripanotión; no se ha encontrado la enzima glutatión reductasa (Fairlamb y Cerami, 1985).

El tripanotión (N1, N8-bis(glutationil) espermidina, (T(SH)₂) es un tiol de bajo peso molecular sintetizado por la conjugación de dos moléculas de glutatión reducido y espermidina, en una reacción dependiente de ATP (Fairlamb *et al.*, 1987; Fairlamb y Cerami, 1985). Esta reacción es catalizada por dos enzimas, la glutationil-espermidina sintetasa y la tripanotión sintetasa. Ambas enzimas son muy específicas y características de los tripanosomátidos (Fairlamb y Cerami, 1992). En *T. cruzi* el rol del tripanotión es reducir al glutatión oxidado y además, tiene una función equivalente a la del glutatión en los mamíferos, es decir, actúa como un protector intracelular frente a agentes oxidantes endógenos y exógenos (Fairlamb y Cerami, 1992). Otras funciones del tripanotión incluyen la mantención de la homeostasis de ascorbato (Krauth-Siegel y Lüedermann, 1996), la reducción de hidroperóxidos (Flohe, 1999; Wilkinson *et al.*, 2000), la síntesis de desoxirribonucleotidos (Lüedermann *et al.*, 1998) así como conjugación con metales y drogas (Maya *et al.*, 1997).

El glutatión es sintetizado mediante la acción sucesiva de las enzimas γ -glutamil cisteinil sintetasa (γ -GCS) y la glutatión sintetasa, cuyas actividades dependen de ATP. El glutatión reducido inhibe por retroalimentación de manera no alostérica a la γ -GCS.

La γ -glutamil-cisteinil sintetasa inicia la síntesis del glutatión y puede ser inhibida por un conjunto de análogos químicos, siendo uno de ellos la D-L-butionina [S,R] sulfoximina (BSO), análogo del estado transitorio en la unión del γ -glutamilo y la cisteína (Anderson, 1998), la cual presenta alta especificidad por la enzima. La inhibición de la γ -glutamil-cisteinil sintetasa, se debe a que BSO o su derivado fosforilado por ATP se unen fuertemente, pero no en forma covalente, al sitio activo de la enzima. La figura 3 muestra el modo de acción de BSO y la síntesis de tioles en *T. cruzi*.

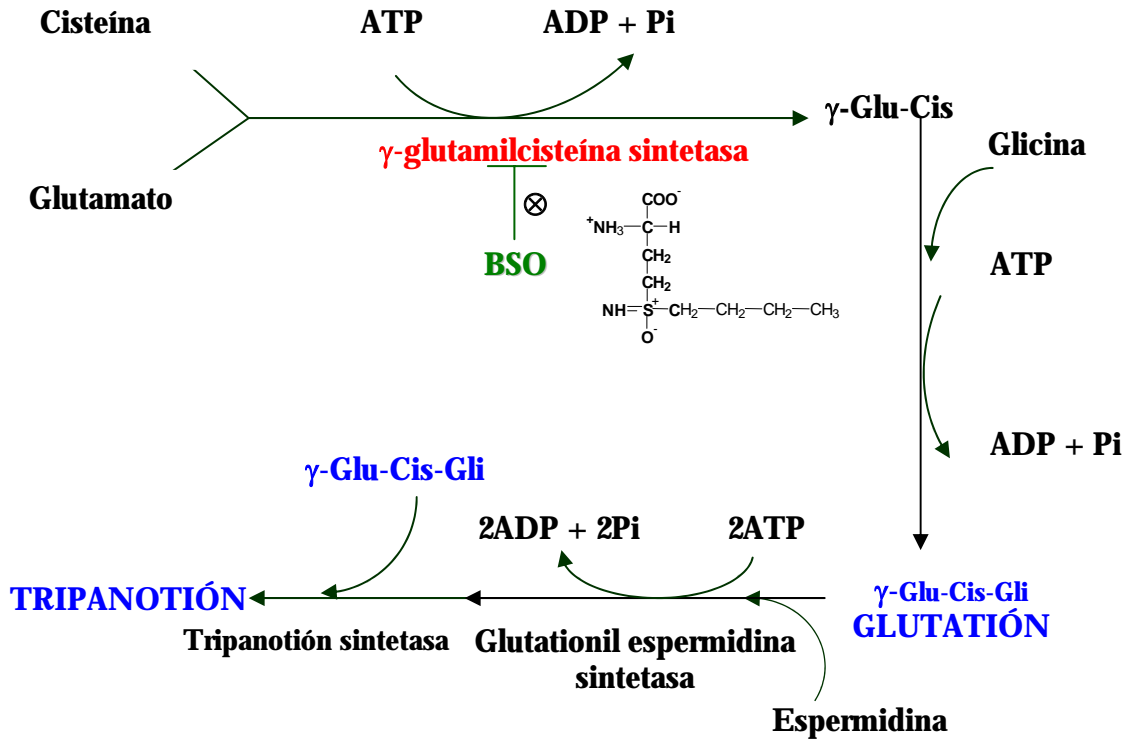


Figura 3.- Síntesis de Tioles en *Trypanosoma cruzi*.

Podemos concluir que en los tripanosomátidos, los sistemas de defensa son deficientes frente al estrés oxidativo comparado con los de los mamíferos. El *T. cruzi* presenta actividad superóxido dismutasa muy baja, ausencia de glutatión peroxidasa y catalasa y no se ha demostrado la presencia de α -tocoferol o de β -caroteno (Aldunate y Morello, 1993). De lo anterior se desprende que, el glutatión y el tripanotión (molécula exclusiva de los tripanosomátidos) constituyen el principal mecanismo de defensa contra radicales libres y agentes electrofílicos, producidos por las drogas antichagásicas.

Además, se ha observado que en varias cepas de *T. cruzi*, cuando son tratados con BSO, la concentración de GSH disminuye en un 50%, potenciando la toxicidad de nifurtimox y benznidazol (Moncada *et al.*, 1989; Repetto *et al.*, 1996). Esta observación puede ser explicada, porque el *T. cruzi* tiene niveles de GSH libre y conjugado mucho más bajos que los niveles de GSH de los hospederos mamíferos (Moncada *et al.*, 1989; Morello *et al.*, 1994; Repetto *et al.*, 1996; Maya *et al.*, 1997; Stoppani, A.O., 1999), lo cual constituye una importante diferencia bioquímica y potencial blanco terapéutico.

La disminución en el contenido de GSH en el hospedero humano, podría significar algún problema terapéutico, pero aparentemente, esta estrategia no tiene consecuencias tóxicas según lo informado en experimentos en humanos (Bailey *et al.*, 1994; O'Dwyer *et al.*, 1996; Bailey *et al.*, 1997).

HIPÓTESIS

El glutatión y su análogo conjugado, el tripanotión, constituyen el principal mecanismo de defensa contra radicales libres y agentes electrofílicos, producidos por las drogas nifurtimox y el benznidazol.

La inhibición de la síntesis de glutatión por butionina sulfoximina, potencia el efecto tripanocida de estos dos fármacos antichagásicos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la potenciación de la actividad tripanocida de nifurtimox y benznidazol, inhibiendo la síntesis de GSH en cultivos de células VERO y ratones infectados con *T. cruzi*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Evaluar el efecto tripanocida de butionina sulfoximina, nifurtimox, benznidazol y de las combinaciones butionina sulfoximina-nifurtimox y butionina sulfoximina-benznidazol en células VERO infectadas con *T. cruzi*.

- II. Evaluar el efecto terapéutico de butionina sulfoximina, nifurtimox, benznidazol y de las combinaciones butionina sulfoximina-nifurtimox y butionina sulfoximina-benznidazol en ratones infectados con *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

En el estudio *in vitro* se utilizaron las cepas MF (Muñoz *et al.*, 1994), LQ (Aldunate *et al.*, 1988), Tulahuén (Pizzi, 1957) y clon Dm28c (Contreras *et al.*, 1988). Las distintas cepas de parásitos se obtuvieron de la colección de *T. cruzi* del laboratorio de Farmacología Molecular y Clínica y Bioquímica de Parásitos, Instituto de Ciencias Biomédicas, de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile. Los experimentos se realizaron en el mismo laboratorio, exclusivo para el cultivo, manipulación y experimentación con tripanosomas vivos o viables y se trabajó con guantes, lentes y en campana de flujo laminar. Para el estudio *in vivo* se utilizaron tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén, mantenida por pasajes sucesivos en ratones BALB/c, en el bioterio del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Occidente de la Universidad de Chile.

Células VERO

Se sembraron células tipo fibroblastos de riñón de mono verde (VERO) en frascos de cultivo Falcon® de 25 cm² a una densidad de 20.000 células/cm², en medio RPMI suplementado con bicarbonato de sodio 0,22%, estreptomina 100 µg/mL, penicilina 100 µg/mL y suero fetal bovino al 10% para crecimiento o al 5% para mantenimiento. Una vez que hubo confluencia de las células VERO, se cambió el medio de cultivo por medio fresco con o sin BSO o drogas y las células fueron incubadas a 37° C, en ambiente humidificado y CO₂ 5% durante 96 horas, cambiando el medio cada 24 horas (Urbina *et al.*, 2003). Trabajos realizados previamente en este laboratorio, demostraron que BSO a una concentración de 25 µM es capaz de reducir en un 90% la concentración de GSH sin afectar la viabilidad celular. También se ha demostrado que nifurtimox y benznidazol a las concentraciones utilizadas en esta memoria no afectan la viabilidad de las células VERO (Ortiz, 2004), razón por la cual usamos esta concentración en los experimentos que se describen en esta memoria.

Índice Endocítico

Se sembraron células VERO en frascos de cultivo Falkcon® de 25 cm², con medio RPMI, suplementado con bicarbonato de sodio 0,22%, estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 µg/mL y suero fetal bovino al 5 %, a una concentración de 100.000 células/mL e infectadas con tripomastigotes a la razón de tres parásitos por célula en las cepas MF, LQ, y a una razón de diez parásitos por célula en la cepa Tulahúen y clon Dm28c. A las 24 horas de iniciada la infección, se adicionaron las drogas, nifurtimox, benznidazol, BSO y las respectivas combinaciones. El efecto de los tratamientos sobre los amastigotes fue determinado luego de 120 horas de iniciada la infección (antes de que las formas tripomastigotas salieran de las células), en cámara de Neubauer, por recuento manual, donde se determinó el número total de células VERO, el número de células VERO infectadas y el número de amastigotes intracelulares por célula infectada, a partir de 10 campos seleccionados aleatoriamente, por visualización directa en un microscopio de contraste de fase (Zeiss Photomicroscope II). Además, se tomaron microfotografías (cámara digital NIKON modelo coolpix 995), a partir de las cuales se contaron manualmente las células VERO y los amastigotes intracelulares. Con estos datos se determinó el índice endocítico, definido como el porcentaje de células infectadas, multiplicado por el promedio de amastigotes intracelulares (Franke de Cazzulo *et al.*, 1998), siendo un indicador del efecto de las drogas utilizadas en modelos *in vitro* de la enfermedad de Chagas. Además, se determinó la concentración necesaria para disminuir en un 50% el índice endocítico (IC₅₀), a partir de las curvas dosis respuesta arrojadas por el análisis de los distintos tratamientos.

Determinación de proteínas totales

La cantidad de proteína en los distintos cultivos se determinó mediante el método de Lowry *et al.* (1951), utilizando como estándar albúmina de bovino fracción IV. Este parámetro se utilizó para una estimación indirecta del número de amastigotes, a partir del contenido de proteína en el cultivo. Se restó la proteína total encontrada de la proteína correspondiente a células VERO, calculada a partir de una curva estándar. El número de amastigotes se determinó dada la relación 1 mg de proteína corresponde a 220.000.000 amastigotes.

Ratones

Se utilizaron ratones machos, de la cepa BALB/c de 9 semanas de edad, con un peso promedio de 25 gramos, obtenidos del vivero del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Occidente, Universidad de Chile, proporcionándoles alimento y agua *ad libitum*. El manejo de los ratones, contó con la aprobación del Comité de Bioética sobre Investigación en Animales, de la Facultad de Medicina, dentro del marco del proyecto FONDECYT 1020095.

Modelo de infección

Los ratones fueron inoculados intraperitonealmente con 3×10^5 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* y se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de 6 animales cada uno: 1) ratones no infectados sin tratamiento, 2) ratones no infectados con los distintos tratamiento, 3) ratones infectados sin tratamiento, 4) ratones infectados con los distintos tratamientos.

Administración de drogas

Nifurtimox y benznidazol se disolvieron en aceite comestible de maravilla para su administración por vía oral, mediante una sonda orofaríngea, a razón de dos dosis diarias de 5,0 mg/kg para nifurtimox y 2,5 mg/kg para benznidazol, en un volumen final de 125 μ L para cada dosis. BSO se preparó en agua destilada estéril y se administró por vía intraperitoneal (i.p.), en un volumen final de 100 μ L para cada dosis, a razón de dos dosis diarias de 2 mmoles/kg cada una. Esta dosis está justificada, por cuanto en ratones, BSO 4 mmoles/kg disminuye en más del 50 %, los niveles de GSH en todos los tejidos estudiados, sin la presencia de patologías asociadas o un comportamiento anormal de los ratones tratados (Griffith y Meister, 1979). Adicionalmente, en *T. brucei*, esta misma dosis es capaz de disminuir significativamente la cantidad de GSH, eliminando las parasitemias, sin producir toxicidad en los ratones tratados (Arrick *et al*, 1981).

Estudio de parasitemia

Luego de confirmar la presencia de parásitos en sangre, se comenzó a evaluar cuantitativamente las parasitemias por microscopía directa (examen de sangre fresca) y se iniciaron los tratamientos. Los ratones infectados sin tratamiento y ratones infectados con tratamiento fueron monitoreados diariamente, para determinar la parasitemia. Se tomaron 5 μ L de sangre fresca de la punta de la cola de los animales infectados y se hizo recuento manual, por gota gruesa. Los resultados del número de parásitos obtenidos en cada día de estudio se expresaron como promedio de parasitemia del grupo, más la desviación estándar correspondiente.

Análisis estadístico

Las curvas dosis/respuesta fueron ajustadas utilizando el software Origin® versión 7.0, de OriginLab Corporation. Para medir la significancia de la diferencia entre las curvas dosis/respuesta, fue empleada la prueba de Fischer, considerándose un $p < 0,05$. El test de Student fue usado para determinar la significancia estadística de las diferencias entre los IC_{50} de cada droga. La misma prueba estadística fue utilizada para determinar las diferencias entre las parasitemias de los grupos estudiados. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Para los análisis estadísticos se utilizó el software Origin® versión 7.0, de OriginLab Corporation. El análisis de supervivencia se hizo de acuerdo al método de Kaplan-Meier y la comparación de las curvas de supervivencia se realizó mediante el método Mantel-Henszel, considerándose $p < 0,05$, como estadísticamente significativo. Todos los resultados se presentan como el promedio \pm DS de por lo menos tres experimentos independientes.

RESULTADOS

ESTUDIOS *IN VITRO*

Efecto de Nifurtimox y Benznidazol y su asociación con BSO en células VERO infectadas con *Trypanosoma cruzi*.

Para evaluar el efecto de nifurtimox, benznidazol y de su asociación con BSO sobre amastigotes intracelulares, se infectaron células VERO con tripomastigotes de las distintas cepas de *T. cruzi*, como se describe en materiales y métodos y luego de 24 horas de infección se adicionaron los distintos tratamientos. Transcurridas 96 horas de iniciado el tratamiento, se determinó el grado de infección, mediante el recuento de amastigotes intracelulares por medio de visualización microscópica directa y por la determinación de proteínas totales del cultivo.

En la figura 4 se muestran microfotografías representativas de células VERO infectadas con la cepa MF de *T. cruzi*, luego de 96 horas de tratamiento con nifurtimox y la asociación de éste a BSO 25 μM . En ella se puede observar claramente que BSO 25 μM , no afecta la cantidad de células infectadas y de los amastigotes intracelulares, con respecto al grupo Control. Por otra parte, se observa que la disminución de células infectadas y de los amastigotes intracelulares se ve aumentada al asociar nifurtimox a BSO 25 μM , con respecto al grupo Control y al grupo tratado sólo con BSO 25 μM .

En los grupos tratados con benznidazol, las células infectadas y la cantidad de amastigotes intracelulares, se ven disminuidas al asociar la droga con BSO 25 μM , con respecto al grupo Control y al grupo BSO 25 μM . A la observación microscópica estos grupos no presentaron diferencias a los grupos tratados con nifurtimox, razón por la cual no se muestran dichas microfotografías.

Resultados similares se obtuvieron en células VERO infectadas con las cepas LQ, Tulahuén y clon Dm28c de *T. cruzi*, expuestas a los distintos tratamientos descritos.

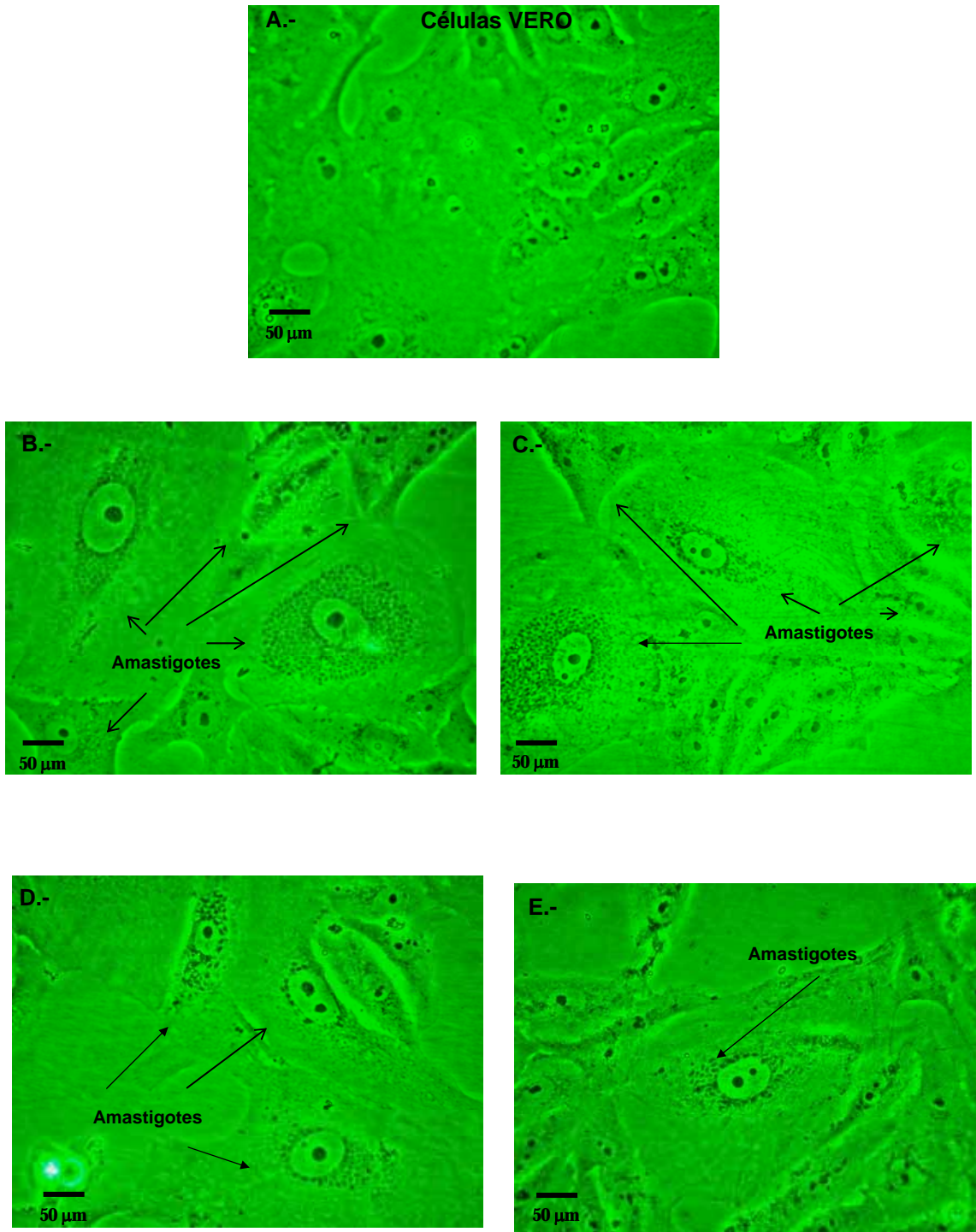
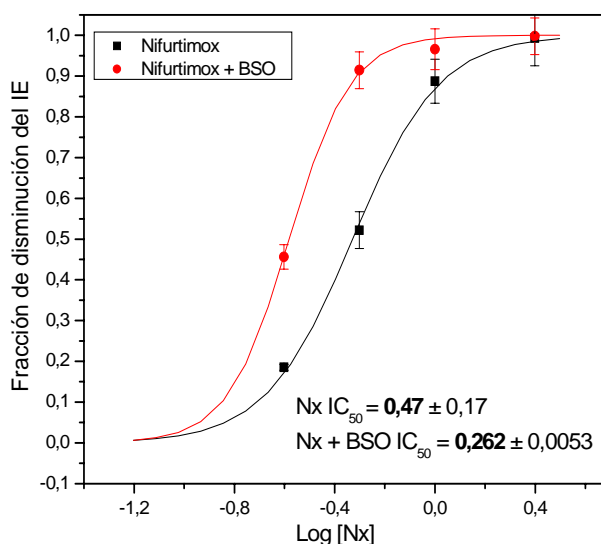


Figura 4.-Microfotografía del efecto de nifurtimox 0,5 μM y nifurtimox 0,5 μM asociado a BSO 25 μM, sobre células VERO infectadas con la cepa MF de *T. cruzi*, luego de 120 horas de infección. **A.-** Células VERO sin infectar. **B.-** Células VERO infectadas. **C.-** Células VERO infectadas más BSO 25 μM. **D.-** Células VERO infectadas tratadas con nifurtimox 0,5 μM. **E.-** Células VERO infectadas, tratadas con nifurtimox 0,5μM más BSO 25 μM.

Las figuras 5, 6, 7 y 8 presentan las curvas dosis-respuesta del efecto tripanocida de distintas concentraciones de nifurtimox, benznidazol y de su asociación con BSO 25 μM , en células VERO infectadas con las cepas MF, LQ, Tuluhuén y clon Dm 28c de *T. cruzi*. En ella observamos que el índice endocítico para el grupo nifurtimox se ve disminuido al asociar nifurtimox con BSO 25 μM . Situación similar se observa en los grupos tratados con benznidazol, comparado con los grupos tratados con benznidazol asociado a BSO 25 μM .

Al análisis estadístico se observaron diferencias significativas de las curvas dosis-respuesta, para los grupos tratados con nifurtimox o benznidazol asociados a BSO 25 μM , con respecto a los grupos tratados sólo con nifurtimox o benznidazol ($p < 0,05$).

Nifurtimox



Benznidazol

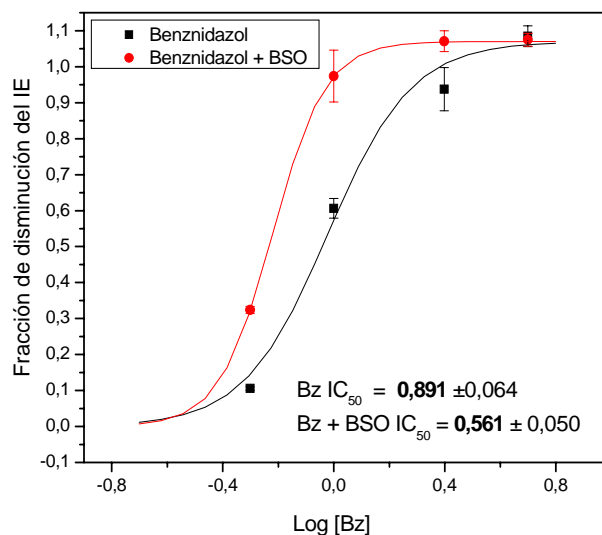
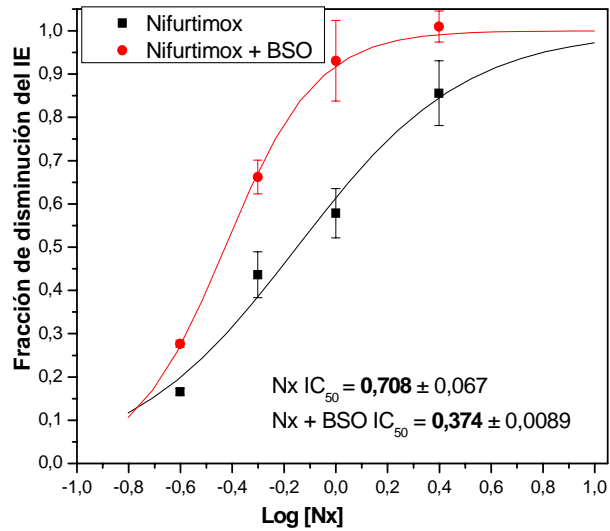


Figura 5.- Efecto de nifurtimox, benznidazol y su asociación a BSO 25 μ M, en células VERO infectadas con la cepa MF de *T. cruzi*. El índice endocítico (I.E.) se determinó mediante microfotografía y mediante la determinación de proteínas totales. Los valores de IC_{50} para nifurtimox y benznidazol versus nifurtimox asociado a BSO 25 μ M y benznidazol asociado a BSO 25 μ M, respectivamente, son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). Los valores de IC_{50} están expresados en concentraciones μ M y corresponde al promedio de tres experimentos independientes \pm DS.

Nifurtimox



Benznidazol

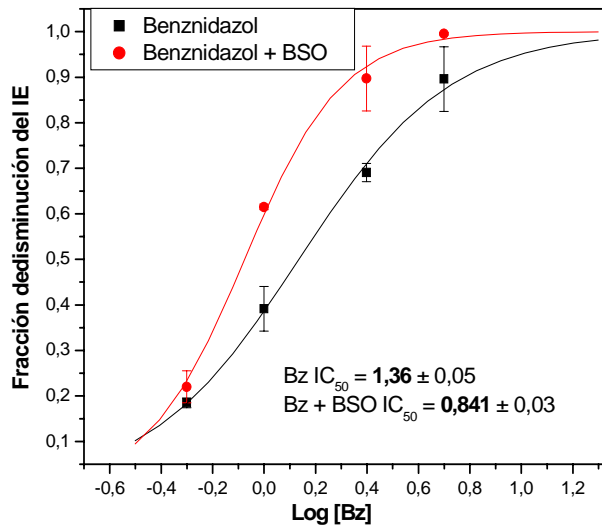
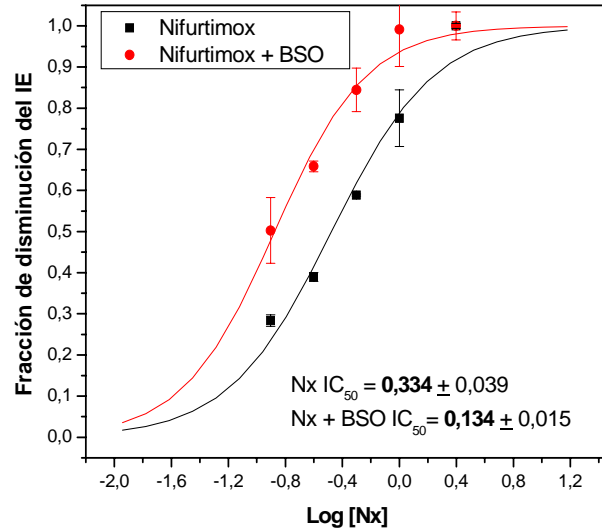


Figura 6.- Efecto de nifurtimox, benznidazol y su asociación a BSO 25 μ M, en células VERO infectadas con la cepa LQ de *T. cruzi*. El I.E. se determinó mediante microfotografía y mediante la determinación de proteínas totales. Los valores de IC₅₀ para nifurtimox y benznidazol versus nifurtimox asociado a BSO 25 μ M y benznidazol asociado a BSO 25 μ M, respectivamente, son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). Los valores de IC₅₀ están expresados en concentraciones μ M y corresponde al promedio de tres experimentos independientes \pm DS.

Nifurtimox



Benznidazol

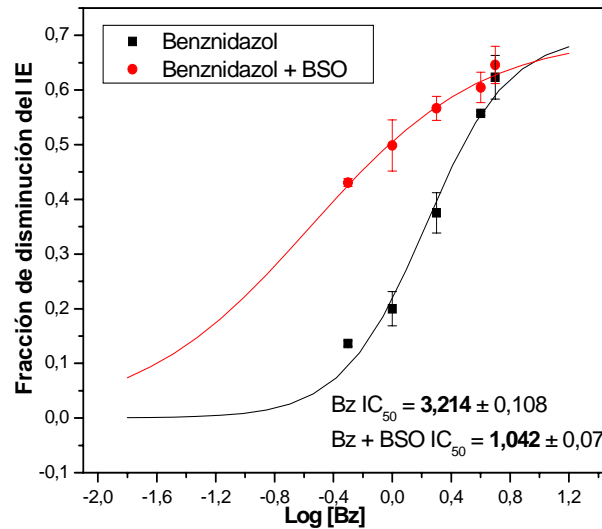
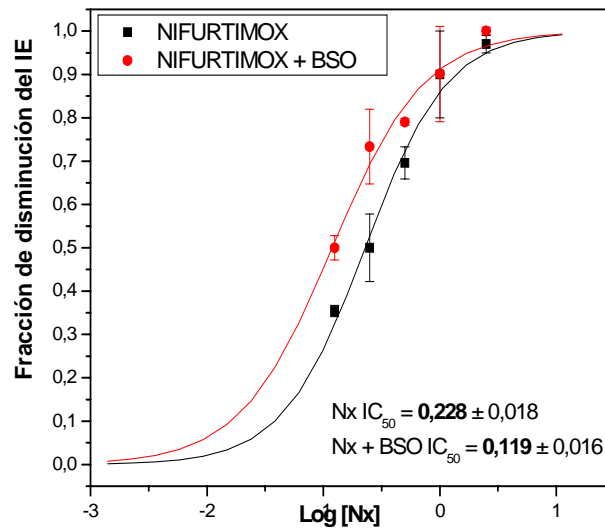


Figura 7.- Efecto de nifurtimox, benznidazol y su asociación a BSO 25 μ M, en células VERO infectadas con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*. El I.E. se determinó mediante microfotografía y mediante la determinación de proteínas totales. Los valores de IC_{50} para nifurtimox y benznidazol versus nifurtimox asociado a BSO 25 μ M y benznidazol asociado a BSO 25 μ M, respectivamente, son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). Los valores de IC_{50} están expresados en concentraciones μ M y corresponde al promedio de tres experimentos independientes \pm DS.

Nifurtimox



Benznidazol

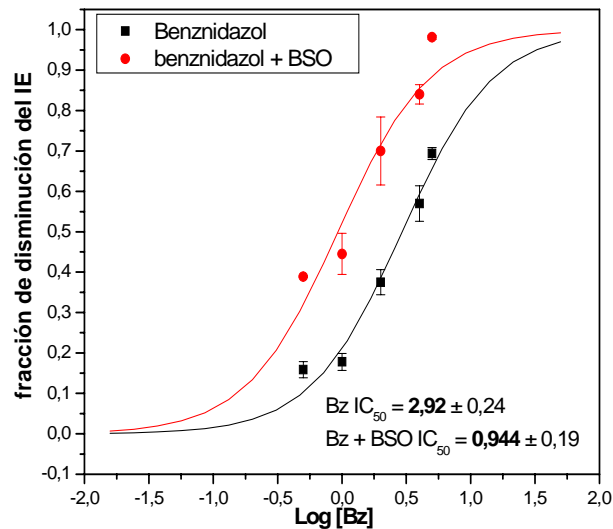


Figura 8.- Efecto de nifurtimox, benznidazol y su asociación a BSO 25 μ M, en células VERO infectadas con la cepa clon Dm28c de *T. cruzi*. El I.E. se determinó mediante microfotografía. Los valores de IC₅₀ para nifurtimox y benznidazol versus nifurtimox asociado a BSO 25 μ M y benznidazol asociado a BSO 25 μ M, respectivamente, son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$). Los valores de IC₅₀ están expresados en concentraciones μ M y corresponde al promedio de tres experimentos independientes \pm DS.

Los cuadros 1 y 2 nos resumen los valores IC₅₀ para nifurtimox, benznidazol y su asociación con BSO sobre células VERO, infectadas con las cepas MF, LQ, Tulahuén y clon Dm28c de *T. cruzi*. En ellas podemos observar que BSO 25 µM disminuye, de forma estadísticamente significativa, el IC₅₀ para nifurtimox y benznidazol (p<0,05) en todas las cepas estudiadas.

CUADRO 1.- Valores IC₅₀ para nifurtimox y su asociación con BSO 25 µM, en células VERO infectadas con distintas cepas de *T. cruzi*. Valores de IC₅₀ están expresados en concentraciones µM. * Indica número de veces en que se disminuyó la concentración de nifurtimox, al asociarlo a BSO.

Cepa de <i>T. cruzi</i>	Nx	Nx + BSO	Nx/Nx+BSO
MF	0,470 ± 0,17	0,262 ± 0,0053	*1,8
LQ	0,708 ± 0,067	0,374 ± 0,0089	*1,9
Tulahuén	0,334 ± 0,039	0,134 ± 0,015	*2,5
clon Dm 28c	0,228 ± 0,018	0,119 ± 0,016	*1,9

CUADRO 2.- Valores IC₅₀ para benznidazol y su asociación con BSO 25 µM, en células VERO infectadas con distintas cepas de *T. cruzi*. Valores de IC₅₀ están expresados en concentraciones µM * Indica número de veces en que se disminuyó la concentración de Bz, al asociarlo a BSO.

Cepa de <i>T. cruzi</i>	Bz	Bz + BSO	Bz/Bz+BSO
MF	0,891 ± 0,06	0,561 ± 0,05	*1,6
LQ	1,36 ± 0,05	0,841 ± 0,03	*1,6
Tulahuén	3,214 ± 0,11	1,042 ± 0,07	*3
clon Dm 28c	2,92 ± 0,24	0,944 ± 0,19	*3

ESTUDIOS *IN VIVO*

Efecto de nifurtimox, benznidazol y su asociación con BSO sobre ratones BALB/c, infectados con *T. cruzi*, cepa Tulahuén.

Para estudiar el efecto *in vivo* de la asociación de drogas antichagásicas (Nx y Bz) con BSO, se infectaron ratones de la cepa BALB/c con 3×10^5 tripomastigotes, cepa Tulahuén de *T. cruzi* y se dividieron aleatoriamente. Luego de 4 días de infección, donde se observaron parásitos en sangre, se administraron los tratamientos con nifurtimox y benznidazol y sus respectivas asociaciones con BSO.

La figura 9 muestra las parasitemias de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi* que recibieron 4 mmoles/kg/día de BSO, además de las parasitemias del grupo control. Los valores de las parasitemias del grupo BSO y Control, alcanzan su máximo el día 5 post infección (p.i.). A partir del día 6 p.i. las parasitemias del grupo Control disminuyen, para luego aumentar y mantenerse en un rango de 5×10^5 y 6×10^5 parásitos por mL de sangre, hasta el final del estudio. El grupo BSO también comienza a disminuir sus parasitemias a partir del día 6 p.i., desde el cual se observa una disminución progresiva, llegando a ausencia de parasitemia a partir del día 18 p.i. Al análisis estadístico, las diferencias fueron significativas a partir del día 6 p.i., situación que se mantiene hasta el final del estudio.

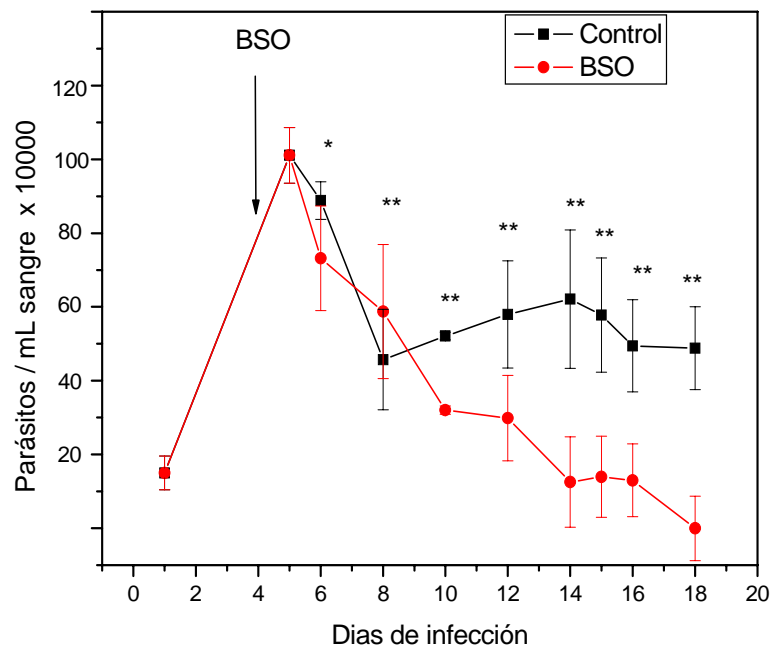


Figura 9.- Parasitemia de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, tratados con BSO. Los ratones se infectaron con 3×10^5 tripomastigotes de la cepa Tulahuén, las parasitemias se siguieron cada 48 hrs. Se consideraron diferencias estadísticas con * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$. Test de Student.

La figura 10 muestra la sobrevida de los grupos Control y BSO. Se observa que los ratones del grupo Control comienzan a morir luego de 12 días p.i. y al día 20 p.i. sólo ha sobrevivido el 33,3 % de ellos, en cambio el grupo BSO presenta un 100% de sobrevida a lo largo de todo el estudio. Al hacer el análisis estadístico de las curvas de sobrevida del grupo Control versus el grupo BSO, se observan diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$. Test de Mantel-Henszel).

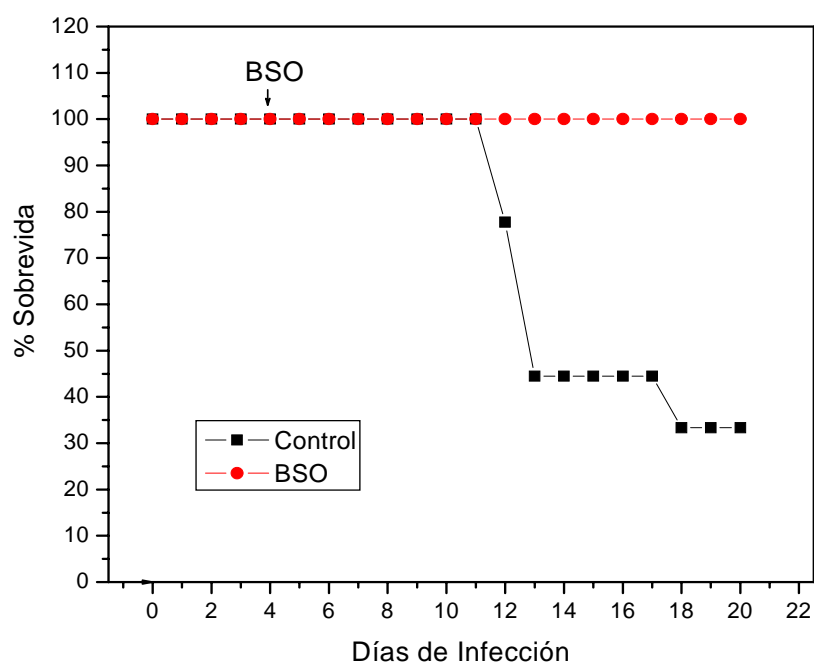


Figura 10.- Sobrevida de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, tratados con BSO. Los ratones se infectaron con 3×10^5 tripomastigotes de la cepa Tulahuén y la mortalidad fue evaluada diariamente. Se consideraron diferencias estadísticas con $p < 0,05$; Test de Mantel-Henszel.

En la figura 11 observamos que ratones tratados con Nifurtimox a una dosis de 5 mg/Kg, alcanzan su máximo en las parasitemias el día 5 p.i., al igual que el grupo Control. A partir del día 6 p.i., las parasitemias de ambos grupos comienzan a disminuir y aunque los valores de las parasitemias del grupo nifurtimox sobrepasaron las parasitemias del grupo Control, durante casi todo el desarrollo del estudio, al análisis estadístico no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

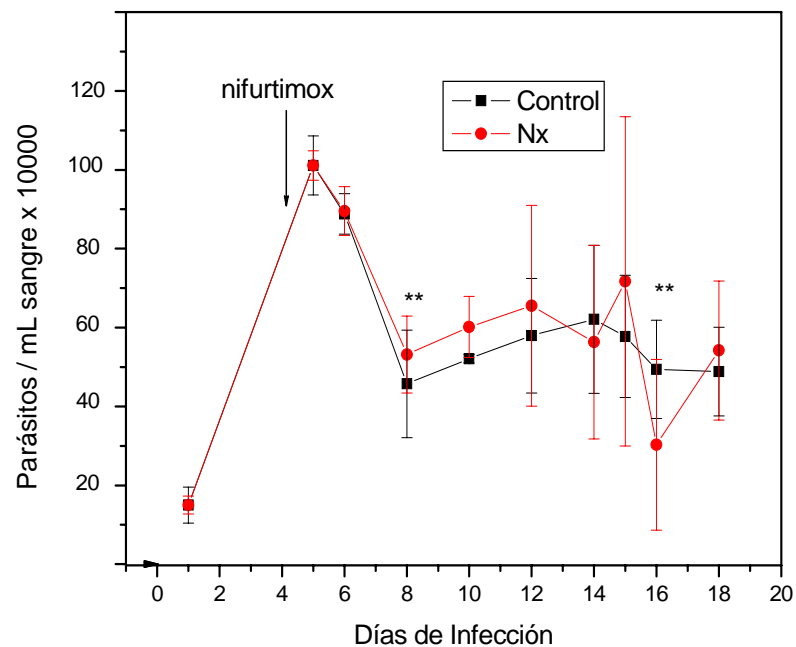


Figura 11.- Parasitemia de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, tratados con nifurtimox. Los ratones se infectaron con 3×10^5 tripomastigotes de la cepa Tulahuén, las parasitemias se siguieron cada 48 hrs. Sólo en los puntos indicados, se encontraron diferencias estadísticas con ** $p < 0,005$ utilizando el Test de Student.

La figura 12 muestra la sobrevida del grupo nifurtimox y grupo Control. Se observa que ambos grupos presentan 100% de sobrevida hasta el día 12 p.i., a partir del cual disminuye el porcentaje de sobrevida del grupo nifurtimox, hasta llegar a un 50% de sobrevida al final del estudio, por ende el grupo nifurtimox sobrepasa la sobrevida del grupo Control. A pesar de lo anterior, al análisis estadístico no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos con $p \geq 0,05$; por el Test de Mantel-Henszel.

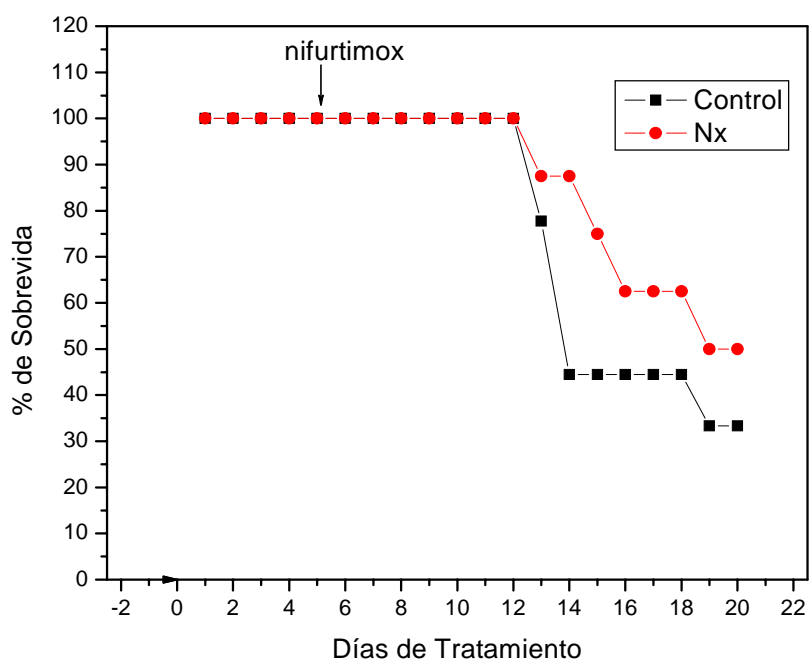


Figura 12.- Sobrevida de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, tratados con nifurtimox. Los ratones se infectaron con 3×10^5 tripomastigotes de la cepa Tulahuén y la mortalidad fue evaluada diariamente. No se observaron diferencias significativas entre las curvas de sobrevida de ambos grupos por el Test de Mantel-Henszel.

En la figura 13 observamos las parasitemias del grupo tratado con benznidazol 2,5 mg/Kg, versus grupo Control. Ambos grupos alcanzan su máximo en las parasitemias el día 5 p.i., a partir del cual disminuyen sin diferencias significativas, hasta el día 15 p.i. donde las parasitemias del grupo benznidazol disminuyen más que las del grupo Control, observándose diferencias significativas entre ambos grupos, hasta el final del estudio, con $p < 0,05$; por Test de Student.

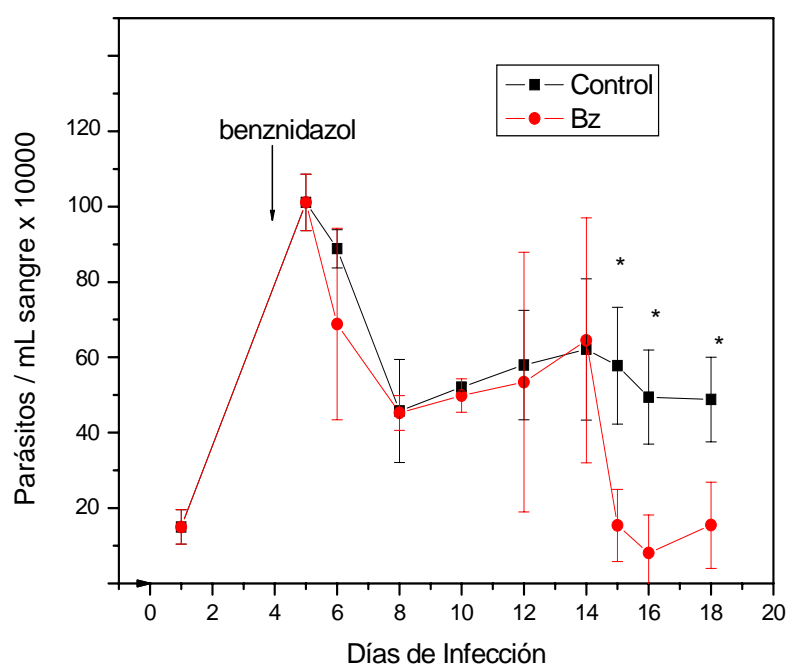


Figura 13.- Parasitemia de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, tratados con benznidazol. Los ratones se infectaron con 3×10^5 tripomastigotes de la cepa Tulahuén, las parasitemias se siguieron cada 48 hrs. Se consideraron diferencias estadísticas con $*p < 0,05$ y se utilizó el Test de Student para comparar las parasitemias.

La figura 14 muestra la sobrevivencia del grupo Benznidazol versus grupo Control. En ella observamos que a partir del día 11 p.i. la sobrevivencia del grupo benznidazol disminuye a un 50%, para terminar al final del estudio con un 37,5% de sobrevivencia. A pesar que la sobrevivencia del grupo benznidazol fue menor a la observada en el grupo Control, al análisis estadístico no se observaron diferencias significativas entre las curvas de sobrevivencia de ambos grupos, con $p \geq 0,05$; por Test de Mantel-Henszel.

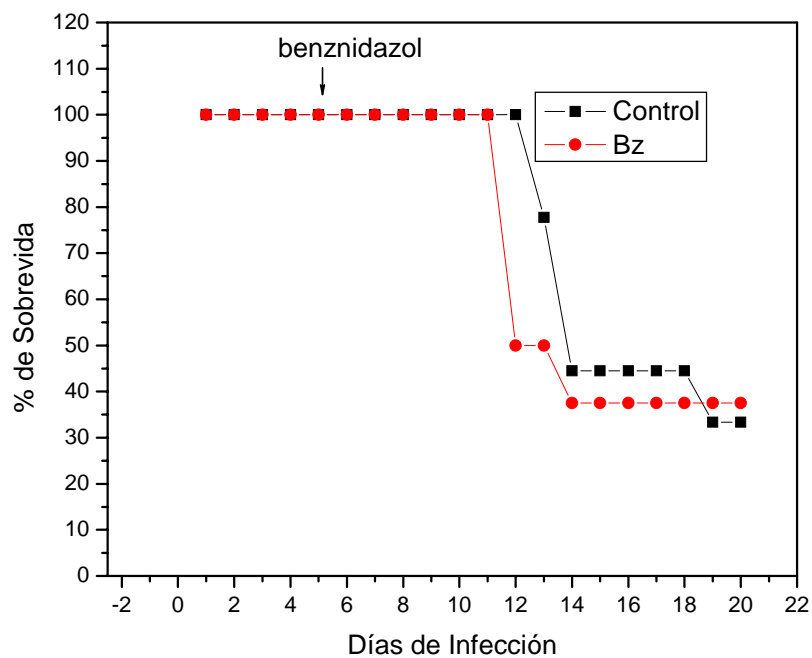


Figura 14.- Sobrevivencia de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, tratados con benznidazol. Los ratones se infectaron con 3×10^5 tripomastigotes de la cepa Tulahuén y la mortalidad fue evaluada diariamente. No se observaron diferencias significativas entre las curvas de sobrevivencia de ambos grupos por el Test de Mantel-Henszel.

En la figura 15 observamos la parasitemia del grupo tratado con nifurtimox (5 mg/Kg) asociado a BSO (4 mmoles/Kg/día) versus el grupo Control. Las parasitemias del grupo nifurtimox asociado a BSO, alcanza su primer máximo el día 5 p.i. al igual que el grupo Control. A partir del día 6 p.i. las parasitemias de ambos grupos comienzan a disminuir, pero al llegar al día 12 p.i., la parasitemia del grupo BSO más Nx disminuye bajo el nivel del grupo Control y al día siguiente las parasitemias aumentan por sobre el grupo Control, llegando a un máximo de $1,3 \times 10^6$ parásitos/mL al final del estudio. Al análisis estadístico ambos grupos presentan diferencias significativas.

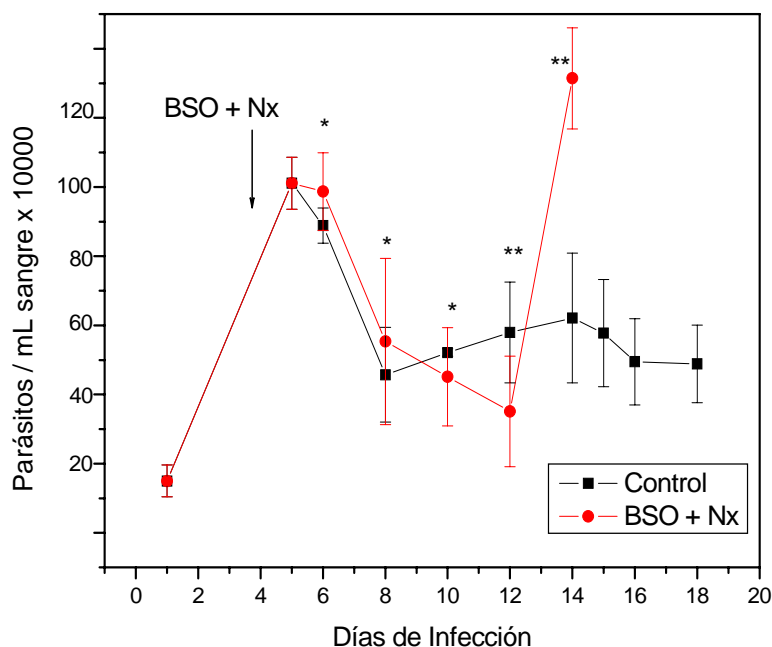


Figura 15.- Parasitemia de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, tratado con nifurtimox asociado a BSO. Los ratones se infectaron con 3×10^5 tripomastigotes de la cepa Tulahuén, las parasitemias se siguieron cada 48 hrs. Se consideraron diferencias estadísticas con * $p < 0,05$ y ** $p < 0,005$ utilizando el Test de Student.

La figura 16 muestra la sobrevida del nifurtimox asociado a BSO versus el grupo Control. En ella observamos que el grupo nifurtimox asociado a BSO, hasta el día 13 p.i., presenta 100% de sobrevida, pero al día siguiente alcanza un 100% de mortalidad, a diferencia de lo observado en el grupo Control, en que llegamos a un 33% de sobrevida hasta el final del estudio. Al análisis estadístico se observan diferencias significativas entre las curvas de sobrevida de ambos grupos, con $p < 0,05$; por el Test de Mantel-Henszel.

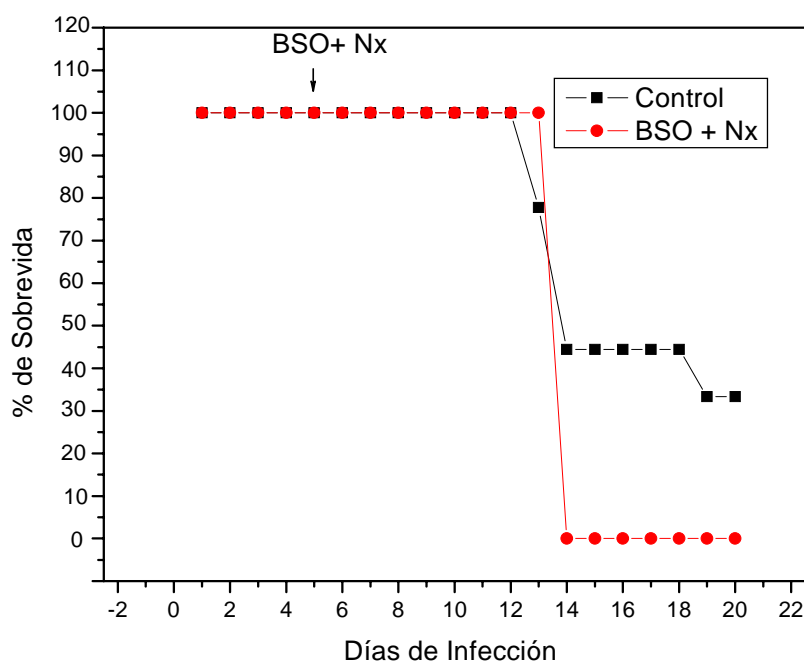


Figura 16.- Sobrevida de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, tratado con nifurtimox asociado a BSO. Los ratones se infectaron con 3×10^5 tripomastigotes de la cepa Tulahuén y la mortalidad fue evaluada diariamente. Se observaron diferencias significativas entre las curvas de sobrevida de ambos grupos por el Test de Mantel-Henszel, con $p < 0,05$.

En la figura 17 observamos las parasitemias del grupo tratado con benznidazol (2,5 mg/Kg) asociado a BSO (4 mmoles/Kg/día) versus las parasitemias del grupo Control. Ambos grupos alcanzan el máximo de sus parasitemias al día 5 p.i., para luego disminuir, aunque al día 7 p.i. la disminución de la parasitemia del grupo benznidazol asociado a BSO, es menor a la observada en el grupo Control, situación que se mantiene hasta el final del estudio. Al análisis estadístico, las parasitemias de ambos grupos presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

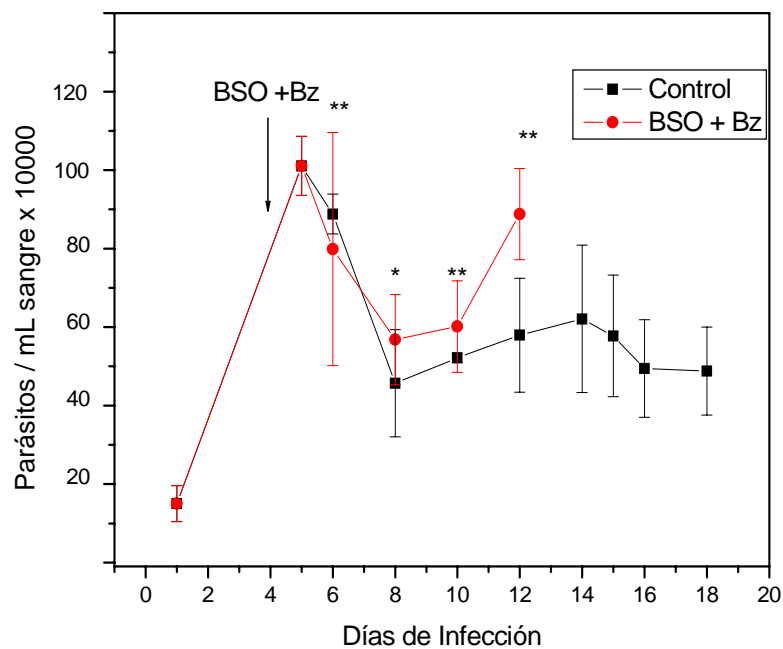


Figura 17.- Parasitemia de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, tratado con benznidazol asociado a BSO. Los ratones se infectaron con 3×10^5 tripomastigotes de la cepa Tulahuén, las parasitemias se siguieron cada 48 hrs. Se consideraron diferencias estadísticas con $*p < 0,05$ y $**p < 0,005$ utilizando el Test de Student.

La figura 18 muestra la sobrevida del grupo tratado con benznidazol asociado a BSO, versus el grupo Control. En ella observamos que hasta el día 10 p.i. ambos grupos presentan 100% de sobrevida. Al día 11 p.i. el grupo benznidazol asociado a BSO disminuye su sobrevida a un 66%, luego al día 13 p.i. disminuye a un 33% y al día siguiente la mortalidad alcanza el 100%, a diferencia de lo que ocurre en el grupo Control, en que la sobrevida llega a un 33% hasta el final del estudio. Al análisis estadístico se observan diferencias significativas en las curvas de sobrevida de ambos grupos con $p < 0,05$; por Test de Mantel-Henszel.

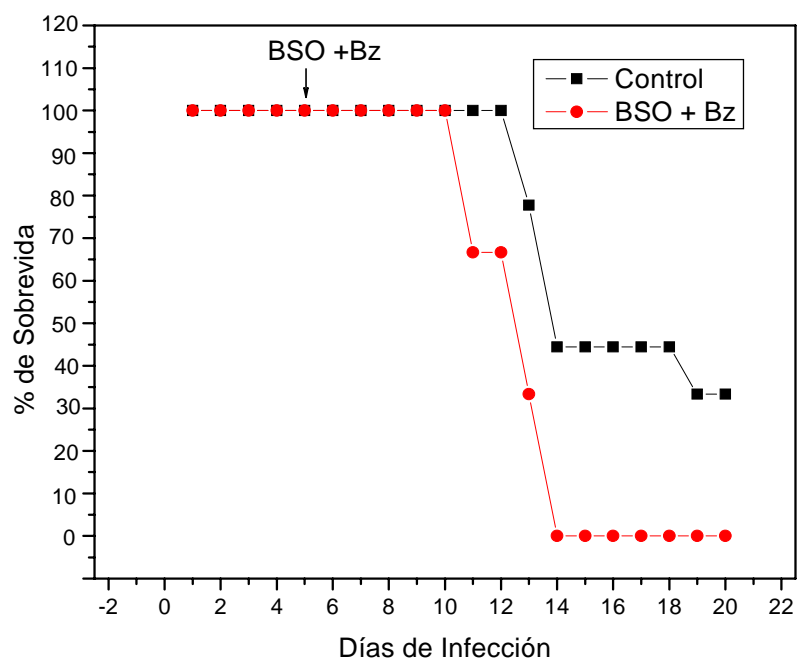


Figura 18.- Sobrevida de ratones BALB/c infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, tratado con benznidazol asociado a BSO. Los ratones se infectaron con 3×10^5 tripomastigotes de la cepa Tulahuén y la mortalidad fue evaluada diariamente. Se observaron diferencias significativas entre las curvas de sobrevida de ambos grupos por el Test de Mantel-Henszel, con $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas presenta una de las mayores preocupaciones en materia de salud pública para América Latina, siendo después de la malaria, la enfermedad ligada a vectores de mayor prevalencia y mortalidad (Atías, 1998; WHO, 2002).

Nifurtimox, benznidazol y BSO disminuyen la cantidad de tioles totales por dos mecanismos distintos (Maya *et al.*, 1997). Por un lado, BSO inhibe la síntesis de GSH y por otro los metabolitos electrofílicos derivados de nifurtimox y benznidazol se conjugan con los tioles libres. En ambas situaciones, la concentración del GSH y T(SH)₂ se disminuye, permitiendo que el aumento de los metabolitos electrofílicos o radicales libres derivados de las drogas antichagásicas aumenten el daño a *T. cruzi*.

Trabajos realizados previamente en este laboratorio, demostraron la potenciación del efecto tripanocida de las drogas nifurtimox y benznidazol sobre tripomastigotes aislados de distintas cepas de *T. cruzi*, al asociarlas con BSO (López, 2005). Además se ha demostrado que BSO a una concentración de 25 µM es capaz de reducir en un 90% la concentración de GSH sin afectar la viabilidad celular (Ortiz, 2004).

En esta memoria demostramos que los efectos antichagásicos de nifurtimox y benznidazol sobre amastigotes en células VERO infectadas con distintas cepas de *T. cruzi*, fueron sustancialmente potenciados al combinarlos con BSO 25 µM. (figura 4). Así, cuando los grupos son tratados con la asociación de BSO más nifurtimox o benznidazol, observamos que los valores de IC₅₀ disminuyen en promedio 1,9 veces en las cepas MF, LQ y clon Dm28c y 2,7 veces en promedio para cepa Tulahuén, comparado con los grupos tratados sólo con nifurtimox o benznidazol (cuadros 1 y 2). La situación observada con la cepa Tulahuén, se podría relacionar con la baja cantidad de tioles libres que contiene esta cepa, en comparación con las otras cepas estudiadas (Repetto *et al.*, 1996; Maya *et al.*, 1997).

El GSH es un eficaz atrapador de radicales libres y tiene la capacidad de conjugarse con especies electrofílicas, (Sies, 1999); además, las drogas antichagásicas, nifurtimox y benznidazol, producen su efecto farmacológico mediante la generación (por nitroreducción) de estas especies (figura 2). Entonces, la depleción en los niveles de GSH resulta en un

aumento de los efectos nocivos descritos para estos agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, la célula de mamífero, al poseer una mayor cantidad de mecanismos antioxidantes, debe experimentar aumentos discretos en los efectos deletéreos mediados por estas drogas.

En *T. cruzi*, la inhibición sostenida de la γ -GCS con la consecuente disminución de los niveles de GSH, podría inducir algunos cambios adaptativos, como por ejemplo, aumento de la expresión o la actividad de la enzima, efecto descrito en mamíferos (Tian *et al.*, 1997), o aumento en la expresión de metalotioneinas frente a una disminución de GSH descrita recientemente en *T. cruzi* (Maya *et al.*, 2003). Además, en mamíferos esta enzima puede ser inducida o activada en respuesta a diversos estímulos, tales como estrés oxidativo, citoquinas inflamatorias, algunos fármacos e incluso ante la presencia de antioxidantes (Griffith, 1999). La concurrencia de estos y otros posibles procesos adaptativos tanto en el hospedero como en el parásito, podrían influir en la efectividad de la terapia de BSO y drogas antichagásicas.

En nuestros estudios *in vivo*, observamos que ratones tratados sólo con BSO a una dosis de 4 mmoles/Kg/día, disminuyen sus parasitemias a cero mucho antes de lo observado en el grupo control y presentaron 100% de sobrevida, durante el desarrollo del estudio (figura 9 y 10). Esta situación también fue observada por Arrick *et al.* en 1981, donde ratones infectados con *T. brucei* fueron curados utilizando solamente BSO (4mM). La misma situación (aunque en menor eficiencia), se observó al tratar con BSO a macrófagos infectados con *Leishmania donovani* (Kapoor *et al.*, 2003).

Para explicar este fenómeno inesperado, podemos mencionar que el metabolismo oxidativo del *T. brucei* es muy activo, por lo que genera grandes cantidades de radicales libres derivados del oxígeno. La disminución de GSH y T(SH)₂ producida por inhibición de γ -GCS con BSO es letal para el parásito. Sin embargo, la situación para el *T. cruzi* es más compleja. En respuesta a la infección por *T. cruzi*, los macrófagos de ratón aumentan la producción de óxido nítrico, lo que asociado al “*Bursf*” (“*estallido*”) respiratorio producido por la activación de estas células, se genera el radical peroxinitrito, que es un poderoso antiparasitario. En ausencia de GSH y de T(SH)₂ por la acción del BSO, el peroxinitrito sería deletéreo para el parásito intracelular, lo que explicaría la disminución de las parasitemias, anterior al grupo control y la mantención de un 100% en la sobrevida de los ratones infectados con *T. cruzi*, tratados con BSO.

Contrario a lo postulado, los grupos tratados con BSO asociado a nifurtimox o benznidazol presentaron parasitemias más altas a las observadas en los grupos tratados sólo con nifurtimox o benznidazol. También presentaron un 100% de mortalidad al final del estudio. La causa de este resultado es desconocida. Sin embargo, se ha observado que disminuciones muy importantes del contenido de GSH produce fragmentación del DNA en linfocitos, lo que puede llevar a apoptosis de estas células y por lo tanto, inducir una eventual deficiencia en la función inmunológica del hospedero (Townsend *et al.*, 2003). Por otro lado, el *T. cruzi* por si mismo es capaz de inducir un estado antiinflamatorio en el hospedero durante la infección aguda con el objetivo de evadir la respuesta inmune. Entre los mecanismos inducidos por el *T. cruzi* para evadir la respuesta inmune esta la activación del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y aumento en la síntesis de prostaglandinas. Ambas disminuyen la síntesis de oxido nítrico y por lo tanto favorecen el crecimiento intracelular del parásito. Por otro lado, el perfil inmunológico de los ratones BALB/c los hace particularmente susceptibles a la infección aguda por *T. cruzi*. Estos ratones no pasan a la fase crónica de la enfermedad. Es posible que la asociación de nifurtimox y benznidazol con BSO genere un estado de supresión inmunológica tan marcado en el ratón, que favorezca el crecimiento casi explosivo del *T. cruzi*, explicando el incremento en las parasitemias y consecuente mortalidad en los ratones. Cabe destacar que los ratones controles sin infectar tratados con nifurtimox y benznidazol y su respectiva asociación a BSO, no presentaron alteraciones patológicas evidentes y se observó 100% de supervivencia de estos grupos, durante el desarrollo del estudio, resultados que no se muestran en el texto.

Por lo anterior, es necesario complementar los resultados obtenidos con otros estudios que determinen si la combinación de las drogas antichagásicas con BSO, tienen un real efecto tóxico sobre otras cepas de ratones, pues la cepa utilizada (BALB/c) desarrolla una respuesta inmune tipo Th₂ e hipersensibilidad a la infección con *T. cruzi*, haciendola más susceptible y por ende no es capaz de sobrevivir a la fase aguda de la enfermedad de Chagas.

En vista que actualmente no se han desarrollado nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, ni drogas más eficaces que nifurtimox y benznidazol, la estrategia terapéutica de BSO puede ser una excelente alternativa para los pacientes con mal de Chagas. Sin embargo, es necesario realizar más estudios en modelos *in vivo* de la enfermedad para comprobar su real eficacia.

CONCLUSIONES

1. BSO 25 μM no tiene actividad tripanocida sobre cultivos de células VERO infectadas con *T. cruzi*.
2. BSO 25 μM aumenta el efecto tripanocida de nifurtimox y benznidazol sobre la forma intracelular amastigota, en células VERO infectadas con *T. cruzi*.
3. BSO 4 mmoles/Kg/día disminuye las parasitemias a cero, en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, cepa Tulahuén.
4. BSO 4 mmoles/Kg/día mantiene la sobrevida en un 100%, en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, cepa Tulahuén.
5. BSO aumentó el efecto tripanocida de nifurtimox y benznidazol en el modelo *in vitro*. Sin embargo esta observación no se repitió en el modelo *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- **ALDUNATE, J. ; VASQUEZ, X.; MUÑOZ, L.; LIPCHENCA, I.; Y REPETTO, Y.** 1988. Efecto de la glucosa y del oxígeno en cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Parasitología al Día*. 12 (2):52-56.
- **ALDUNATE, J. AND MORELLO, A.** 1993. Free radicals in the mode of action of parasitic drugs. *Free radicals in tropical diseases* (Auroma, O.I Ed.) Harwood Academic Publishers. Pp:137-165.
- **ANDERSON, M.E.** 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* 111-112:1-14.
- **APT, W.** 1999. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas. *Parasitología al Día*. 23:100-112.
- **ARRICK, B.A.; GRIFFITH, O.W. Y CERAMI, A.** 1981. Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for trypanosomiasis. *J. Exp. Med.* 153:720-725.
- **ATÍAS, A.** 1998. *Parasitología Médica*. 1ª ed. Santiago. Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda. Pp. 251-264.
- **AUFDERHEIDE, A.C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ; J. BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L.E. JR.; FORNACIARI, G. Y ALLISON M.** 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(7):2034-2039.
- **BAILEY, H.H.; MULCAHY, R.T.; TUTSCH, K.D.; ARZOOMANIAN, R.Z.; ALBERTI, D.; TOR, M.B.; WILDING, G.; POMPLUN, M.; AND SPRIGGS, D.R.** 1994. Phase I clinical trial of intravenous L- buthionine sulfoximine and melphalan: an attempt at modulation of glutathione. *J. Clin. Oncol.* 12:194-205.
- **BAILEY, H.H.; RIPPLE, G.; TUTSCH, K.D.; ARZOOMANIAN, R.Z.; ALBERTI, D.; FEIERABEND, C.; MAHVI, D.; SCHINK, J.; POMPLUN, M.; MULCAHY, R.T. AND WILDING G.** 1997. Phase I study of continuous-infusion L-S,R-buthionine sulfoximine with intravenous melphalan. *J. Natl. Cancer Inst.* 89(23):1789-1796.

- **CANALS M.; SOLIS R.; TAPIA C.; EHRENFELD M.; CATTAN P.** 1999. Comparison of some behavioral and physiological feeding parameters of *Triatoma infestans* Klug, 1834 and *Mepraia spinolai* Porter, 1934, vectors of Chagas disease in Chile. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 5:687-692

- **CASTRO, J.A. AND DIAZ DE TORANZO, E.G.** 1988. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American Trypanosomiasis (Chagas' Disease). Biomed. Environ. Sci. 1:19-33.

- **CLARK, D.; ALBRECHT, M.; AREVALO, J.** 1994. Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 66(1):143-145.

- **CHAGAS, C.** 1909. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen, n.sp., agente etiológico do nova entidade mórbida do homen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1:159-218.

- **CONTRERAS V.T.; ARAUJO-JORGE T.; BONALDO M.; THOMAZ N.; BARBOSA H.; MEIRELLES M.; GOLDENBERG S.** 1988. Biological aspect of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 83: 123-133.

- **DIAZ DE TORANZO, E.G.; CASTRO, J.A.; FRANKE DE CAZZULO, B.M. AND CAZZULO, J.J.** 1988. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. Experientia. 44(10):880-881.

- **DOCAMPO, R. AND STOPPANI, A.O.M.** 1979. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. Arch. Biochem. Biophys. 191:317-321.

- **DOCAMPO, R., MORENO, S.N.J.; STOPPANI, A.O.M.; LEON, W.; CRUZ, F.S.; VILLALTA, F. AND MUNIZ, R.F.A.** 1981. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Pharmacol. 30:1947-1951.

- **DOCAMPO, R. AND MORENO, S.N.** 1984. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. Rev. Infect. Dis. 6(2):223-238.

- **DUBIN, M.; MORENO, S.N.J.; MARTINO, E.E.; DOCAMPO, R. AND STOPPANI, A.O.M.** 1983. Increased biliary secretion and loss of hepatic glutathione in rat liver after nifurtimox treatment. *Biochem. Pharmacol.* 32:483-487

- **EATON, D.L.** 2000. Biotransformation enzyme polymorphism and pesticide susceptibility. *Neurotoxicology.* 21(1-2):101-111.

- **FAIRLAMB, A.H.; CERAMI, A.** 1985. Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 14(2):187-198.

- **FAIRLAMB, A.H.; HENDERSON, G.B.; BACCHI, C.J. AND CERAMI, A.** 1987. In vivo effects of difluoromethylornithine on trypanothione and polyamine levels in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24:185-191.

- **FAIRLAMB, A.H. AND CERAMI, A.** 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:695-729.

- **FLOHE, L.; HECHT, H.J. AND STEINERT, P.** 1999. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 27(9-10):966-984.

- **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.

- **FRANKE DE CAZZULO, B.M.; BERNACCHI, A.; ESTEVA, M.I.; RUIZ, A.M.; CASTRO, J.A. AND CAZZULO, J.J.** 1998. Trypanocidal effect of SKF525A, proadifen, on different developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. *Medicina-Buenos Aires.* 58(4):415-418.

- **FRÍAS D.; HENRY A.; GONZÁLEZ CR.** 1998. *Mepraia gajardo*: a new species of Triatomidae (Hemiptera: Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia spinolai*. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 71: 177-188.

- **FU, Y.; CHENG, W.H.; PORRES, J.M.; ROSS, D.A.; LEI, X.G.** 1999. Knockout of cellular glutathione peroxidase gene renders mice susceptible to diquat-induced oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 27(5-6):605-611.

- **GOIJMAN, S.G.; DUBIN, M.; STOPPANI, A.O.** 1988. Nifurtimox and benznidazole inhibit DNA and protein synthesis in rat hepatocytes. *Medicina-Buenos Aires*. 48(6):718-719.

- **GORLA, N.B.; LEDESMA, O.S.; BARBIERI, G.P. AND LARRIPA, I.B.** 1989. Thirteen fold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutation Res.* 224:263-267.

- **GRIFFITH, O.W. AND MEISTER, A.** 1979. Effects of methionine sulfoximine analogs on the synthesis of glutamine and glutathione: possible chemotherapeutic implications. *Cancer Treat. Rep.* 63:1115-1121.

- **GRIFFITH, O.W.** 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med.* 27(9-10):922-935.

- **GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B.** 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 899:136-147.

- **HALLIWELL, B.** 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.* 31(4):261-272.

- **HAYES, J.D., MCLELLAN, L.I.** 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.;* 31(4):273-300.

- **HAYES, R.J. AND SCHOFIELD, C.J.** 1990. Estimate of the incidence rates of chronic parasitosis and infections based on the prevalence: Chagas disease in Latin America. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* 108(4):308-316.

- **ISMAIL, S.O.; PARAMCHUK, W.; SKEIKY, Y.A.; REED, S.G.; BHATIA, A.; GEDAMU, L.** 1997. Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86(2):187-197.

- **KAPOOR, P.; SACHDEV, M. AND MADHUBALA, R.** 2003. Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health.* 5:438-442.

- **KEPPLER, D.** 1999. Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic. Biol. Med.* 27(9-10):985-991.

- **KIRCHHOFF, L.V.** 1993. American Trypanosomiasis (Chagas' Disease) - A Tropical Disease Now in the United States. *New Engl. J. Med.* 329(9), 639-644.

- **KRAUTH-SIEGEL, R.L.; LÜEDERMAN, H.** 1996. Reduction of dehydroascorbate by trypanothione. *Mol. Biochem. Parasitol.* 80:203-208.

- **KRAUTH-SIEGEL, R.L.; COOMBS, G.H.** 1999. Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets. *Parasitol Today.* 15(10):404-409.

- **LÓPEZ, R.** 2005. Potenciación de drogas antichagásicas. Estudio en parásitos aislados y células VERO infectadas con *Trypanosoma cruzi*. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico, Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

- **LORCA, M.; BEROIZA, A.; MUÑOZ, P.; GUAJARDO, U.; SILVA, J.; CANALES, M. Y ATÍAS, A.** 1987. Estudio materno infantil de enfermedad de Chagas en zonas endémicas III:Salamanca, Valle del Choapa, Chile. *Parasitol. Día.* 11:97-100.

- **LOWRY, O.H.; ROSENBROUG, N.J.; FARR, A.L. Y RANDALL, J.R.** 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.,* 193: 265-275.

- **LUDEMANN, H.; DORMEYER, M.; STICHERLING, C.; STALLMANN, D.; FOLLMANN, H.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.** 1998. *Trypanosoma brucei* tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. *FEBS Lett.* 431(3):381-385.

- **MASANA, M.; TORANZO, E.G.D.; CASTRO, J.A.** 1984. Reductive metabolism and activation of benznidazole. *Biochem. Pharmacol.* 33:1041-1045.

- **MASON, R.P. AND HOLTZMAN, J.L.** 1975. The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67(4):1267-1274.

- **MAYA J.D.; REPETTO Y.; AGOSIN M.; OJEDA J.M.; TELLEZ R.; GAULE C. AND MORELLO A.** 1997. Effects of Nifurtimox and Benznidazole upon glutathione and trypanothione in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86, 101-106. 108.

- **MAYA, J.D.; BOLLO, S.; NUNEZ-VERGARA, L.J.; SQUELLA, J.A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PERIE, J. Y CHAUVIERE G.** 2003. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 65(6):999-1006.

- **MAZUR, L.** 2000. Radioprotective effects of the thiols GSH and WR-2721 against X-ray-induction of micronuclei in erythroblasts. *Mutat. Res.* 468(1):27-33.

- **MEHLOTRA, R.K.** 1996. Antioxidant defense mechanisms in parasitic protozoa. *Crit. Rev. Microbiol.* 22(4):295-314.

- **MOLYNEUX, D.H. AND ASHFORD, R.W.** 1983. *The Biology of Trypanosoma and Leishmania, Parasites of Man and Domestic Animals.* London, England, Taylor and Francis, Eds. 294 p

- **MONCADA, C.; REPETTO, Y.; ALDUNATE, J.; LETELIER, M.E.; MORELLO, A.** 1989. Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 94(1):87-91.

- **MONCAYO, A.** 1993. Research priorities. *Rev Soc Bras Med Trop.* 26 Suppl 3:65-71

- **MORELLO, A.; LETELIER, M.E.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y.** 1987. Enfermedad de Chagas, biotransformación de xenobióticos por el *Trypanosoma cruzi*. Estudios en honor de Gustavo Hoecker. *Anales de la Universidad de Chile* 14: 33-48.

- **MORELLO, A.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y.** 1994. Present status of Chagas' disease chemotherapy at the molecular level. *Biology of parasitism*, Ehrlich, R.; Nieto, A, Eds., Montevideo, Uruguay, Ed. Trilce. P. 33-39.

- **MORENO, S.N.; DOCAMPO, R.; MASON, R.P.; LEON, W. AND STOPPANI, A.O.** 1982. Different behaviors of benzimidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch Biochem Biophys.* 218(2):585-591.

- **MUÑOZ, S.; LORCA, M.; MUÑOZ, P.; SOLARI, A.** 1994. Poblaciones de *Trypanosoma cruzi*, altamente homogéneas en una región de baja endemia chagásica: relevancia en la patogenia de la enfermedad de Chagas en Chile. *Rev. Med. Chile.* 122:1231-1238.

- **MURTA, S.M.; 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(2):203-214.

- **MURTA, S.M.; ROPERT, C.; ALVES, R.O.; GAZZINELLI, R.T. Y ROMANHA, A.J.** 1999. In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Parasite Immunol.* 21(10):535-544.

- **O'DWYER, P.J.; HAMILTON, T.C.; LACRETA, F.P.; GALLO, J.M.; KILPATRICK, D.; HALBHERR, T.; BRENNAN, J.; BOOKMAN, M.A.; HOFFMAN, J.; YOUNG, R.C.; COMIS, R.L. AND OZOLS, R.F.** 1996. Phase I trial of buthionine sulfoximine in combination with melphalan in patients with cancer. *J. Clin. Oncol.* 14:249-256.

- **ORTIZ, C.** 2004. Estudio comparado de la toxicidad de nifurtimox y benznidazol sobre *Trypanosoma cruzi*. Efecto de butionina sulfoximina. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico, Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

- **PIZZI T.P.** 1957. Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Universidad de Chile. Santiago. P. 18.

- **POURAHMAD, J.; O'BRIEN, P.J.** 2000. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. *Toxicology.* 143(3):263-273.

- **REPETTO, Y.; OPAZO, E.; MAYA, J.D.; AGOSÍN, M. AND MORELLO, A.** 1996. Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*. Effects of drugs. *Comp. Biochem Physiol.* 115B(2):281-285.

- **RODRIGUES-COURA, J.; L. DE CASTRO, S.** 2002. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 97(1): 3-24.

- **SIES, H.** 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27(9-10):916-921.

- **STOPPANI, A.O.** 1999. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. *Medicina-Buenos Aires* 59 Suppl. 2:147-65.

- **TEMPERTON, N.J.; WILKINSON, S.R.; MEYER, D.J. AND KELLY, J.M.** 1998. Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Mol. Biochem. Parasitol.* 96(1-2):167-176.

- **TIAN, L. SHI, M.M.; FORMAN, H.J.** 1997. Increased transcription of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in rat lung epithelial L2 cells exposed to oxidative stress or glutathione depletion. *Arch. Biochem. Biophys.* 342(1):126-133.

- **TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D.; TAPIERO, H.** 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 57:145-155.

- **URBINA, J.A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; LIRA, R. Y ROMANHA, A.J.** 2003. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int. J. Antimicrob. Agents* 21(1):27-38.

- **WILKINSON, S.R.; TEMPERTON, N.J.; MONDRAGON, A.; KELLY, J.M.** 2000. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 275(11):8220-8225.

- **WHO EXPERT COMMITTEE.** 2002. Second Report. Control of Chagas Disease. Technical Report Series, No. 905.

- **ZAHOOR, A.; LAFLEUR, M.V.; KNIGHT, R.; LOMAN, H.; EDWARDS, D.I.** 1987. DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. *Biochem. Pharmacol.* 36(19):3299-3304.