



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS CON
ÁCIDO ACETILSALICÍLICO Y DE GLUTATIÓN CON
BUTIONINA SULFOXIMINA COMO ESTRATEGIA PARA
AUMENTAR LA EFICACIA DEL FÁRMACO ANTICHAGÁSICO
NIFURTIMOX, EN RATONES.

GLORIA ANDREA TORRES RIVERA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

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

Financiamiento Proyecto FONDECYT 1061072

SANTIAGO, CHILE
2008



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS CON ÁCIDO ACETILSALICÍLICO Y DE GLUTATIÓN CON BUTIONINA SULFOXIMINA COMO ESTRATEGIA PARA AUMENTAR LA EFICACIA DEL FÁRMACO ANTICHAGÁSICO NIFURTIMOX, EN RATONES.

GLORIA ANDREA TORRES RIVERA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: JUAN DIEGO MAYA ARANGO
PROFESOR CONSEJERO:	DANIELA IRAGÜEN CONTRERAS
PROFESOR CONSEJERO:	CLAUDIO ZÚÑIGA MARTI

Financiamiento Proyecto FONDECYT 1061072

SANTIAGO, CHILE
2008

Dedicatoria

Antes que cualquier cosa quisiera dedicarle esta memoria a las personas que ya no están conmigo, pero que han sido tan importantes en mi vida que siempre los llevaré en mi corazón...mis queridos abuelitos...siempre los extrañaré... los quiero mucho.

A mi Josefinitapaz que se fue sin que la pudiera despedir, pero ella sabe que tiene un gran lugar en mi corazón, gracias por todos los momentos lindos que me regalaste....

A mis queridos padres, que sin ellos nada de esto hubiese sido posible. Creo que nunca les he dicho que los amo, pero eso es lo que siento por ustedes. Gracias por todo el apoyo incondicional que día a día entregan, espero llegar algún día a ser como ustedes...

A mis queridos hermanitos, Rodrigo y Gonzalo, gracias por todas las palabras de aliento recibidas y por ese amor de hermanos que cada día me entregan, son los mejores amigos que se puede tener...

Agradecimientos

A mi Jano, por toda la paciencia, apoyo, cariño, en fin todos los momentos que me has entregado, sin ti todo habría sido más difícil, llegaste en el momento preciso, como tú dices “no existen las coincidencias”.

A mi Estrellita que me entrega felicidad y cariño todos los días.

A mi tía Miryam, por haberme dado el “empujoncito inicial” para esta memoria. Gracias por el apoyo y el cariño!!!

A la Doctora Iragüen, por tenerme paciencia y siempre tener buena disposición.

A los profesores del laboratorio, por guiarme, aconsejarme y darme el apoyo académico necesario para sacar adelante esta tesis.

A todos los chicos del laboratorio Rodrigo, Mario, Sebastián E., Paula, por la buena onda y el apoyo. Con especial cariño quisiera agradecer a los que han sido mis amigos, mis confidentes en este camino Ale, Denisse, Javi, Fabián, Seba K. Gracias por todo!!!!

ÍNDICE

ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN	vii
SUMMARY	viii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
Historia.....	3
Epidemiología.....	3
Ciclo del parásito.....	4
Cuadro clínico.....	5
Terapia contra la enfermedad de Chagas.....	6
Metabolismo de los radicales libres	9
Interacción con el hospedero	13
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Materiales.....	19
Métodos.....	19
Ratones.....	19
Modelo de infección.....	19
Administración de drogas y selección de dosis a administrar en asociaciones.....	20
Estudio de parasitemia.....	20
Supervivencia de animales infectados y tratados	21
Estudios Histológicos	22
RESULTADOS.....	23
Efecto de la butionina sulfoximina sobre las parasitemias y supervivencia de ratones BALB/c, infectados con <i>T. cruzi</i> , cepa Dm28c	23
Efecto de la asociación de nifurtimox y BSO sobre ratones BALB/c, infectados con <i>T. cruzi</i> , cepa Dm28c.....	26

Efecto del ácido acetilsalicílico sobre las parasitemias de ratones BALB/c, infectados con <i>T. cruzi</i> , cepa Dm28c.....	29
Efecto de nifurtimox y su asociación con AAS sobre ratones BALB/c, infectados con <i>T. cruzi</i> , cepa Dm28c.....	33
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico del <i>T. cruzi</i>	5
Figura 2. Metabolismo de nifurtimox y benznidazol.	8
Figura 3. Síntesis de tioles en <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
Figura 4. Interacción entre <i>T. cruzi</i> y macrófagos.....	17
Figura 5. Evolución de las parasitemias de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c y tratados con BSO 30 y 220 mg/kg/día.....	24
Figura 6. Efecto de BSO 30 y 220 mg/kg/día sobre la Curva de supervivencia en ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c.	24
Figura 7. Efecto de BSO sobre tejido miocárdico de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c.....	25
Figura 8. Evolución de las parasitemias de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c y tratados con nifurtimox 2,5 mg/kg/día solo y asociado a BSO 220 mg/kg/día.....	27
Figura 9. Comparación de la evolución de las parasitemias de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c tratados con nifurtimox 2,5 mg/kg/día respecto a su asociación a BSO 220 mg/kg/día.....	27
Figura 10. Efecto de BSO 220 mg/kg/día, nifurtimox 2,5 mg/kg/día y la combinación nifurtimox + BSO sobre la curva de supervivencia en ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c.....	28
Figura 11. Comparación del efecto de nifurtimox 2,5 mg/kg/día y su combinación con BSO 220 mg/kg/día sobre tejido miocárdico de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c.....	28
Figura 12. Evolución de las parasitemias de ratones BALB/c infectados con 30000 de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c y tratados con 25 (A), 50 (B) y 100 (C) mg/kg/día de ácido acetilsalicílico..	30
Figura 13. Efecto en la supervivencia de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c y tratados con 5, 10, 25, 50, 75, 100 y 200 mg/kg/día de ácido acetilsalicílico.....	31

Figura 14. Efecto del ácido acetilsalicílico sobre tejido miocárdico de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28 c.	32
Figura 15. Evolución de las parasitemias de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c y tratados con 0,1; 0,5 y 1 mg/kg/día de nifurtimox.	34
Figura 16. Evolución de las parasitemias de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c tratados con AAS 25 mg/kg/día combinada con nifurtimox 0,1; 0,5 y 1 mg/kg/día.	34
Figura 17. Efecto sobre la supervivencia de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c tratados con 0,1; 0,5 y 1 mg/kg/día de nifurtimox.	35
Figura 18. Efecto sobre la supervivencia de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> , clon Dm28c tratados con ácido acetilsalicílico combinado con 0,1; 0,5 y 1 mg/kg/día de nifurtimox.	35

RESUMEN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, producida por el *Trypanosoma cruzi*, es una de las zoonosis más importantes en América latina. Chile contribuye con aproximadamente 150000 infectados, afectando las seis primeras regiones del país.

Las drogas disponibles para el tratamiento son nifurtimox (Nx) y benznidazol (Bz), cuyo mecanismo de acción se basa en aumentar el estrés oxidativo y/o producción de metabolitos electrofílicos que se conjugan con las macromoléculas del protozoo. El principal mecanismo antioxidante es el tiol tripanotión ($T(SH)_2$), que es un conjugado de espermidina y glutatión (GSH). El GSH es sintetizado a partir de glutamato y cisteína por la acción enzimática de la γ -glutamil-cisteinil-sintetasa (GGCS)(etapa limitante), la que puede ser inhibida por la butionina sulfoximina (BSO).

En el hospedero mamífero, este protozoo evade la respuesta inmune induciendo una respuesta antiinflamatoria en los macrófagos, mediada por prostaglandina E_2 (PGE_2) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Este proceso podría ser prevenido por el ácido acetilsalicílico (AAS), que es un inhibidor de la ciclooxigenasa (COX), y por lo tanto de la producción de prostaglandinas.

En la presente memoria se estudió el efecto de BSO, AAS y nifurtimox en ratones infectados con *T. cruzi*.

BSO en dosis de 220 mg/kg/día mostró efecto tripanocida, provocando una disminución en las parasitemias y aumento de la supervivencia de los ratones infectados; además de una disminución en la cantidad de parásitos y del infiltrado inflamatorio en los corazones de estos ratones. Al combinarse con Nx se observó un aumento del efecto tripanocida de este último.

En el caso de AAS observamos que las dosis de 25 y 50 mg/kg/día, disminuyeron las parasitemias e incrementaron las supervivencias de los ratones infectados. Con respecto a los cortes histológicos, se aprecia una disminución en los nidos de amastigotes y en la cantidad de infiltrado inflamatorio. Por el contrario cuando fue combinada con Nx se observó un detrimento en el efecto tripanocida respecto al uso de las drogas individualmente.

Por lo tanto, el uso de BSO en combinación con nifurtimox podría disminuir la dosis de droga necesaria para obtener el mismo efecto clínico y como consecuencia, podría disminuir los efectos colaterales y/o la duración de la terapia.

SUMMARY

American trypanosomiasis or Chagas' disease, produced by *Trypanosoma cruzi* is one of the most important zoonosis in Latin America. Chile contributes with 150000 infected people approximately. The first six regions of the country are affected.

Drugs currently available for treatment are nifurtimox (Nx) and benznidazole (Bz), which their mode of action is based upon oxidative stress increase and/or electrophilic metabolite production that conjugate with protozoan macromolecules. The main antioxidant mechanism is the thiol trypanothione (T(SH)₂), which is a spermidine and glutathione (GSH) conjugate. GSH is synthesized from glutamate and cysteine by γ -glutamyl cysteinyl synthetase (GGCS) being the step limiting reaction of this pathway. Buthionine sulfoximine (BSO) inhibits selectively this enzyme.

In the mammal host, this protozoon evades the immune response throughout an anti-inflammatory response induction in macrophages. This is mediated by prostaglandin E₂ (PGE₂) and transforming growth factor β (TGF- β). This process might be prevented by acetylsalicylic acid (ASA), a cyclooxygenase (COX) inhibitor, and hence, prostaglandin production inhibition.

In this thesis, trypanocidal activity of BSO, nifurtimox and ASA was studied.

In *T. cruzi* infected mice, 220mg/kg/day of BSO alone demonstrated trypanocidal effect by decreasing parasitemias and improving mice survival. Parasite number and inflammatory infiltrate was reduced in infected hearts. This effect was increased when nifurtimox was added.

Similarly, 25 and 50 mg/kg/day of ASA decreased parasitemias and increased mice survival. Also, parasite number and inflammatory infiltrate was reduced in infected hearts. However, nifurtimox does not modify this effect.

Thus, BSO might decrease nifurtimox doses to obtain the same clinical effect and hence, might decrease adverse events or therapy length.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una de las zoonosis más importantes en América latina (WHO, 2002). Se caracteriza por afectar a las regiones más empobrecidas; se calcula que alrededor de 25 millones de personas estarían expuestas al riesgo de infección y que un tercio de los infectados morirán por la enfermedad. Chile contribuye con aproximadamente 150000 casos de infectados, afectando las seis primeras regiones del país (WHO, 2002; Teixeira *et al*, 2006). La enfermedad es provocada por un protozoo hemoflagelado denominado *Trypanosoma cruzi*, el que involucra en su ciclo de vida a insectos vectores y hospederos mamíferos. En Chile se reconocen 2 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 (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).

Existen diferentes modos de infección: 1) vía sanguínea a través del insecto vector (80-90% de la transmisión de la enfermedad); 2) vía transfusión sanguínea o transmisión congénita (0,5-8% de transmisión); 3) otras formas de transmisión menos comunes, por ejemplo, desde la comida o bebida o vía órganos infectados en transplantes (Castro *et al*, 2006).

En general, la interacción entre *T. cruzi* y el hospedero resulta en una variedad de consecuencias que van desde la evasión de la respuesta inmune hasta el control de la infección por las células del hospedero. La ruta activada en el macrófago determina cuál de las dos respuestas predomina (Peluffo *et al*, 2004).

El parásito es muy sensible frente a los procesos oxidativos, ya que sus sistemas para tamponarlos no son tan eficientes como en los mamíferos (Krauth-Siegel *et al*, 2003; Turrens, 2004); por lo que la terapia actual apunta a aumentar el estrés oxidativo con fármacos como el nifurtimox, o a producir compuestos electrofílicos que se conjugan con las macromoléculas del protozoo, como el benznidazol.

Los principales mecanismos de defensa del *T. cruzi* contra radicales libres son el glutatión reducido (GSH) y un conjugado de glutatión y espermidina denominado tripanotión ($\Gamma(\text{SH})_2$), característico de todos los tripanosomátidos e indispensable para la reducción del glutatión (Ariyanayagam y Fairlamb, 2001; Turrens, 2004).

El GSH se sintetiza a través de la enzima γ -glutamyl-cisteinil-sintetasa (GGCS) y la glutatión sintetasa. La butionina sulfoximina (BSO) es un análogo del glutamato que se une fuertemente de manera no covalente al sitio activo de la GGCS, inhibiéndola (etapa limitante) (Anderson, 1998).

El tripanotión es resultante de la acción enzimática de la tripanotión sintetasa que conjuga dos moléculas de glutatión con una de espermidina; esta poliamina es captada por el *T. cruzi*, razón por la que el *T. cruzi* no es afectado por los inhibidores de la síntesis de poliaminas (Burri y Brun, 2003).

El distinto contenido de tioles del *T. cruzi* y del hospedero es una importante diferencia bioquímica que se puede aprovechar terapéuticamente. La posibilidad de inhibir la síntesis de glutatión con BSO es una estrategia capaz de disminuir dramáticamente los tioles, incluyendo al tripanotión, en el *T. cruzi* cuando es tratado con nifurtimox y benznidazol. Esto agravaría la ya precaria defensa del parásito al estrés oxidativo y contra metabolitos electrofílicos (Maya *et al.*, 1997; Ariyanayagam *et al.*, 2003).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Historia

La enfermedad de Chagas es la condición clínica asociada con la infección por *Trypanosoma cruzi*, descrita en el trabajo pionero del Doctor Carlos Chagas, un médico brasileño quien trabajó en el Instituto Oswaldo Cruz en Río de Janeiro. Él describió las formas epimastigote y tripomastigote en el Estado de Minas Gerais, Brasil, en 1909 (Teixeira *et al.*, 2006).

Epidemiología

La enfermedad se extiende coincidentemente a la distribución del vector triatomino desde el paralelo 42°N al sur de Estados Unidos hasta el 42°S en la Patagonia Argentina (Teixeira *et al.*, 2006). El área endémica representa el 46% de Chile en la zona norte desde la primera a la sexta región (Atías, 1998; WHO, 2002).

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; Rodriques Coura y de Castro, 2002).

El riesgo de contraer la enfermedad se asocia en forma directa con la pobreza, pues los insectos triatominos 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 migratorios 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).

En forma ocasional, los parásitos pueden ser transmitidos de la madre al feto resultando en un aborto espontáneo o en enfermedad de Chagas congénita, que en algunas áreas puede presentarse del 2 al 5 % en infantes nacidos de madres infectadas. La transmisión

oral de la infección por *Trypanosoma cruzi* no es común pero es posible, hecho que se ha demostrado con animales de laboratorio y por algunos casos documentados (Teixeira *et al.*, 2006).

La migración de latinoamericanos infectados desde sus áreas originales rurales o urbanas endémicas dentro de sus países o hacia Estados Unidos o países europeos, en busca de oportunidades, ha provocado 2 problemas: la posible transmisión de la enfermedad a través de transfusiones sanguíneas o por trasplantes de órganos. Es importante recalcar a este respecto que alrededor de 100000 personas fueron reportadas como infectados llegados a EEUU y que en 1990, 7 millones de personas emigraron a EEUU desde países donde la enfermedad de Chagas es endémica (Castro *et al.*, 2006).

Por otro lado, según lo reportado por la Organización Mundial de Salud, las tasas de mortalidad varían entre 8 y 12 % dependiendo del país estudiado, la edad, el estado fisiológico de los pacientes y la modalidad del tratamiento recibido (WHO, 2002).

Ciclo del parásito

El *Trypanosoma cruzi* tiene un ciclo de vida indirecta, que involucra insectos hematófagos (triatominos) como hospederos intermediarios y mamíferos, incluyendo al hombre, como hospedero definitivo. La transmisión es provocada principalmente por un insecto infectado con *T. cruzi* (WHO, 2002) (fig.1).

Los triatominos se infectan al consumir sangre de mamíferos que contengan tripomastigotes. En el intestino medio del triatolino, los parásitos se transforman a epimastigotes los cuales se multiplican por fisión binaria, generando después de quince a treinta días los tripomastigotes metacíclicos. Al picar al mamífero el insecto deyecta y sus desechos van acompañados de tripomastigotes metacíclicos, que atraviesan la piel por el sitio de la picadura o a través de las mucosas. Los tripomastigotes penetran a las células y se transforman en amastigotes, que se multiplican por fisión binaria repletando la célula hospedera, rompiéndola y alcanzan la circulación como tripomastigotes sanguíneos, diseminándose por todo el organismo y quedando expuestos a que un nuevo triatolino

hematófago los ingiera, cerrando el ciclo. El parásito se presenta en tres formas diferentes: 1) tripomastigote, forma infectante, no proliferativa; 2) epimastigote, forma multiplicativa que se sitúa en el tubo digestivo del agente vector y en cultivos; y, 3) amastigote, que es la forma multiplicativa intracelular en los mamíferos (Atías, 1998) (fig. 1).

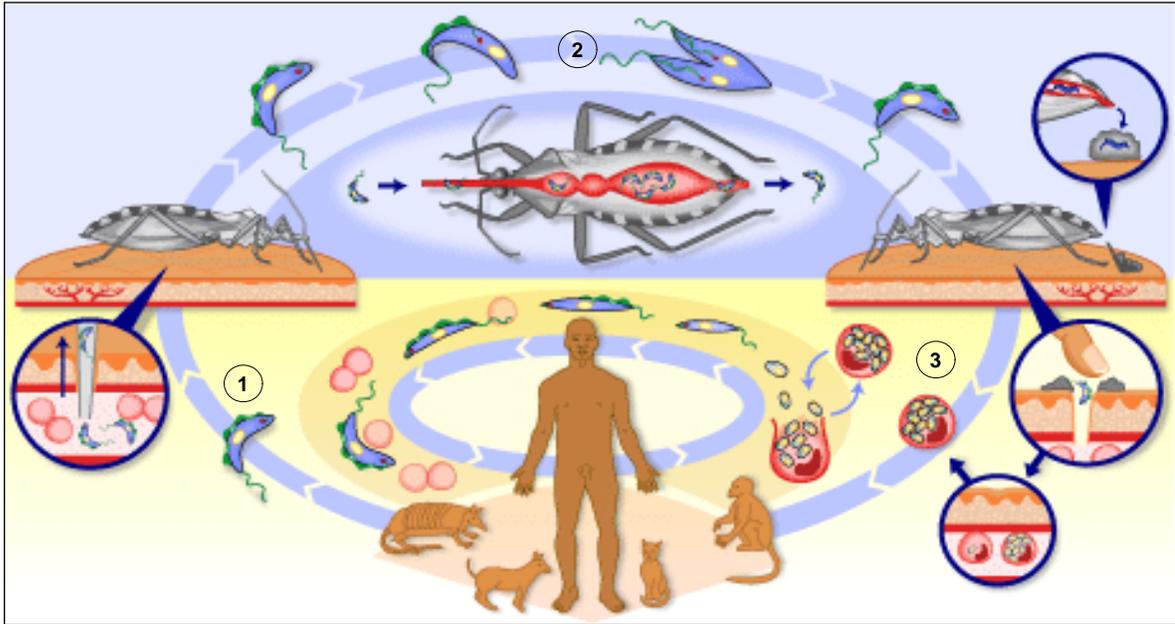


Figura 1. Ciclo biológico del *T. cruzi*. Los números 1, 2 y 3 indican los distintos estados morfológicos del parásito (ver texto anterior) (WHO, 2002).

Cuadro clínico

La enfermedad de Chagas progresa en tres fases. La fase aguda, inmediatamente después de la infección, con una intensa parasitemia, provoca síntomas en sólo algunos pacientes (linfadenopatía regional, edema bipalpebral, unilateral o signo de Romaña y alteraciones electrocardiográficas características). En muchos casos, la infección aguda no presenta manifestaciones clínicas y entra en una fase latente que puede durar meses o años. La fase crónica en el 30% de los infectados está asociada a megacolon, megaesófago, denervación del sistema nervioso autónomo, arritmia cardíaca, hipertrofia e insuficiencia cardíaca progresiva. En esta etapa puede ser incapacitante e incluso responsable de mortalidad (Maya y Morello, 2005).

Puede presentarse miocarditis aguda o meningoencefalitis, particularmente en niños y en pacientes inmunocomprometidos. La mortalidad en pacientes que presentan estos síntomas es cerca del 10% (Castro *et al.*, 2006).

La cardiomiopatía chagásica es la mayor causa de mortalidad e incapacidad en áreas endémicas de México, centro y sudamérica y es reconocida como una infección oportunista en individuos con VIH. *T. cruzi* infecta muchos tipos de células nucleadas en el sistema cardiovascular y gastrointestinal (Ashton *et al.*, 2007).

El diagnóstico puede hacerse por observación microscópica de sangre fresca en la fase aguda. Infecciones crónicas requieren de procedimientos diagnósticos más sensibles con amplificación de parásitos por medio de PCR. Otra opción es el xenodiagnóstico que consiste en tener triatomíneos libres de parásitos y dejar que succionen sangre desde el candidato clínicamente sospechoso y examinar los excrementos de las vinchucas 30 y 60 días después para ver la presencia de parásitos. La detección inmediata de enfermedad de Chagas crónica requiere de la demostración de anticuerpos específicos anti- *T. cruzi* en suero de pacientes o en test basados en ácidos nucleicos, aunque el PCR complementa muy bien esta modalidad diagnóstica (Teixeira *et al.*, 2006).

Terapia contra la enfermedad de Chagas

Desde fines de la década del 60 se empezaron a utilizar dos drogas nitroheterocíclicas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: un nitrofurano, nifurtimox (Nfx) [3-metil-4(nitrofurfurilideneamino)tetrahidro-4H-1,4-tiozina-1,1-dióxido] y un nitroimidazol, benznidazol (Bz) [N-benzil-2-nitroimidazol acetamida] (Castro *et al.*, 2006) (figura 2) ambos con acción tripanocida contra todas las formas parasitarias (Rodrigues Coura y de Castro, 2002). Las dosis recomendadas en la fase aguda son de 8-10 mg/kg/día para nifurtimox y 5 mg/kg/día para benznidazol. La duración del tratamiento es alrededor de 60 -90 días, pero cuando la fase crónica se reactiva, como en pacientes inmunocomprometidos, el tratamiento

puede llegar a 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 profiláctico se limita a 10 días (Maya *et al.*, 2007).

Se ha descrito que existe una mejor respuesta al tratamiento si este se realiza en la fase aguda o en la crónica temprana y en niños (Rodrigues Coura y de Castro, 2002).

La evidencia disponible sugiere que los metabolitos reactivos radicales libres generados durante la nitrorreducción son un radical nitroanión ($R-NO_2^-$) y el radical libre hidronitróxido ($RNHO$). Las enzimas Citocromo P450 reductasa y Citocromo P450 serían las más relevantes involucradas en este proceso. La reacción de $R-NO_2^-$ con el oxígeno puede llevar por medio del reciclaje redox a la formación de anión superóxido (O_2^-) (Castro *et al.*, 2006). Éste, es precursor de la formación de otros radicales libres como son el peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (Temperton *et al.*, 1998). Esta reacción podría ser relevante en condiciones aeróbicas y para el nifurtimox. Durante la biotransformación del benznidazol se formaría un metabolito reactivo ($RNHO$) y sería relevante, *in vivo*, la formación de un amino derivado ($RNHOH$) (Castro *et al.*, 2006) (fig. 2).

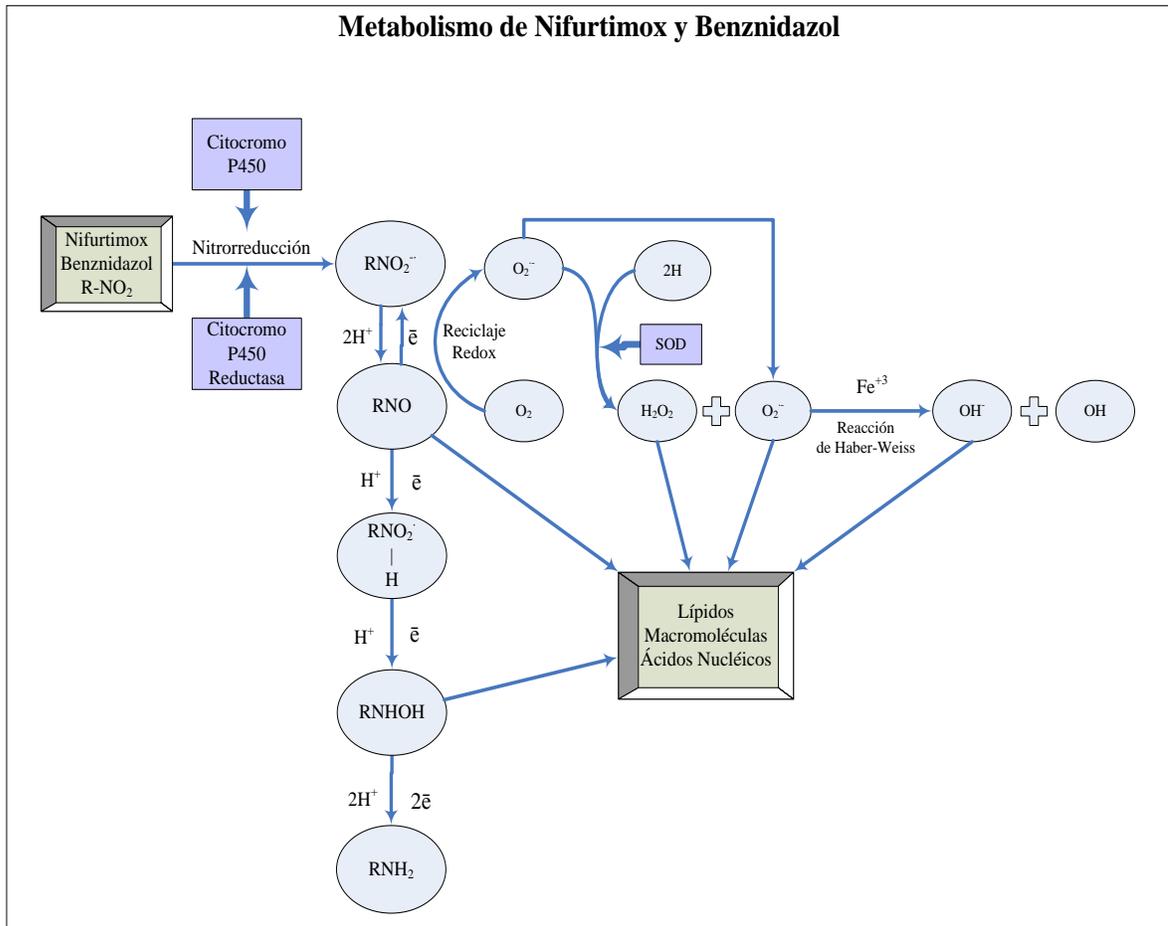


Figura 2. Metabolismo de nifurtimox y benznidazol.

La toxicidad de benznidazol se asocia a la interacción de estos metabolitos reactivos con DNA, proteínas y lípidos, y otros componentes celulares relevantes. Estos mecanismos no sólo estarían involucrados en los efectos citotóxicos en los mamíferos, sino que también en la acción deletérea sobre *T. cruzi*, responsable de sus efectos quimioterapéuticos. En el caso de nifurtimox, la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) serían los responsables tanto de la toxicidad como de los efectos quimioterapéuticos (Castro *et al.*, 2006). Estos metabolitos tanto de nifurtimox como de benznidazol se unen a macromoléculas como lípidos, proteínas y DNA, pudiendo incluso producir mutagénesis y carcinogénesis (Maya y Morello, 2005).

Los efectos citotóxicos y genotóxicos de estas drogas se relacionan a sus estructuras químicas, resultando en la liberación de metabolitos electrofílicos desde la nitro reducción enzimática (Teixeira *et al.*, 2006).

Se observó en ratones que el nifurtimox produce un intenso efecto deletéreo en las células de Sertoli, en la forma y la distribución de espermátidas y espermatozoides maduros. Las alteraciones inducidas por benznidazol fueron de naturaleza similar pero de menor magnitud y frecuencia (Castro *et al.*, 2006).

Estos fármacos pueden producir toxicidad sistémica y efectos colaterales que incluyen manifestaciones digestivas, neurológicas e incluso dérmicas (Castro y Díaz de Toranzo, 1988).

Un elemento adicional que complica el manejo farmacológico de esta enfermedad, por cuanto causa falla terapéutica, es la diferencia de susceptibilidad entre cepas para estos dos agentes (Filardi y Brener, 1987).

Metabolismo de los radicales libres

Los mecanismos de eliminación de radicales libres en mamíferos son múltiples y diversos; poseen enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión-S-transferasa y compuestos reductores como el glutatión reducido (GSH), α -tocoferol, ácido ascórbico y β -caroteno. Además se ha propuesto la existencia de metalotioneínas y que éstas podrían participar en el metabolismo de los radicales libres y los metabolitos electrofílicos (Maya y Morello, 2005).

Los mecanismos de defensa de *T. cruzi* frente al estrés oxidativo (enzimáticos y no enzimáticos) 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. 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 (Wilkinson *et al.*, 2005; Logan *et al.*, 2007).

Entonces, sus principales mecanismos de defensa contra radicales libres serían los tioles glutatión y tripanotión (Krauth-Siegel y Coombs, 1999) (fig. 3).

El glutatión (γ L-glutamyl-L-cisteinyl-glicina, GSH) es el tiol de bajo peso molecular más abundante en las células de mamíferos, y participa, entre otras funciones, en la protección de los efectos tóxicos producidos por compuestos altamente electrofílicos como son ciertos xenobióticos y sus metabolitos y es eficaz atrapador no enzimático de peróxido de hidrógeno y otros radicales libres (Jones *et al.*, 2003).

El GSH es sintetizado mediante la acción sucesiva de las enzimas γ -glutamyl cisteinil sintetasa (GGCS) y la GSH sintetasa (fig. 3). Ambas enzimas requieren ATP. El GSH reducido inhibe por retroalimentación de manera no alostérica a la GGCS (Anderson, 1998).

En mamíferos, el GSH oxidado (GSSG) es reducido por la glutatión reductasa, responsable de mantener la razón GSH:GSSG muy alta. Es más, esta enzima puede catalizar la reducción de disulfuros mixtos entre el GSH y otros compuestos (Fernández y Holmgren, 2004). En *T. cruzi* no se ha encontrado la enzima GSH reductasa, pero se ha demostrado que la reducción de GSSG se efectúa por intermedio del tripanotión (Krauth-Siegel *et al.*, 2003).

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 y Cerami, 1985; Fairlamb *et al.*, 1987) (fig. 3). Esta reacción es catalizada por dos enzimas, la glutatiónil-espermidina sintetasa y la tripanotión sintetasa. Ambas enzimas son muy específicas y características de los tripanosomátidos (Fairlamb y Cerami, 1992). El *T. cruzi* no sintetiza la espermidina sino que la toma del medio donde se encuentra, por ejemplo en los macrófagos, a diferencia del *T. brucei* que si la sintetiza y por ello es sensible a los inhibidores de ornitina descarboxilasa (Burri y Brun, 2003). 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 *et al.*, 1999; Wilkinson *et al.*, 2000), la síntesis de desoxirribonucleotidos (Lüdemann *et al.*, 1998) así como conjugación con metales y drogas (Maya *et al.*, 1997).

La susceptibilidad de *T. cruzi* a nifurtimox y benznidazol está relacionada a los niveles de glutatión libre y conjugado. La butionina sulfoximina (BSO) es un aminoácido análogo al glutamato que inhibe la síntesis de glutationilcisteína y de glutatión y tripanotión. BSO es un análogo del estado de transición de la enzima o un ligando intermediario que se forma en la reacción catalizada por γ -glutamylcistein sintetasa. La butionina sulfoximina es fosforilada en el sitio activo de esta enzima, la inhibición irreversible resulta desde la unión no covalente pero estrecha (tight) de butionina sulfoximina fosfato. Esta inhibición es dosis y tiempo dependiente. Cuando se adiciona esta droga a cultivos de parásitos, las concentraciones intracelulares de glutatión y tripanotión disminuyen en gran cantidad (Faúndez *et al.*, 2005).

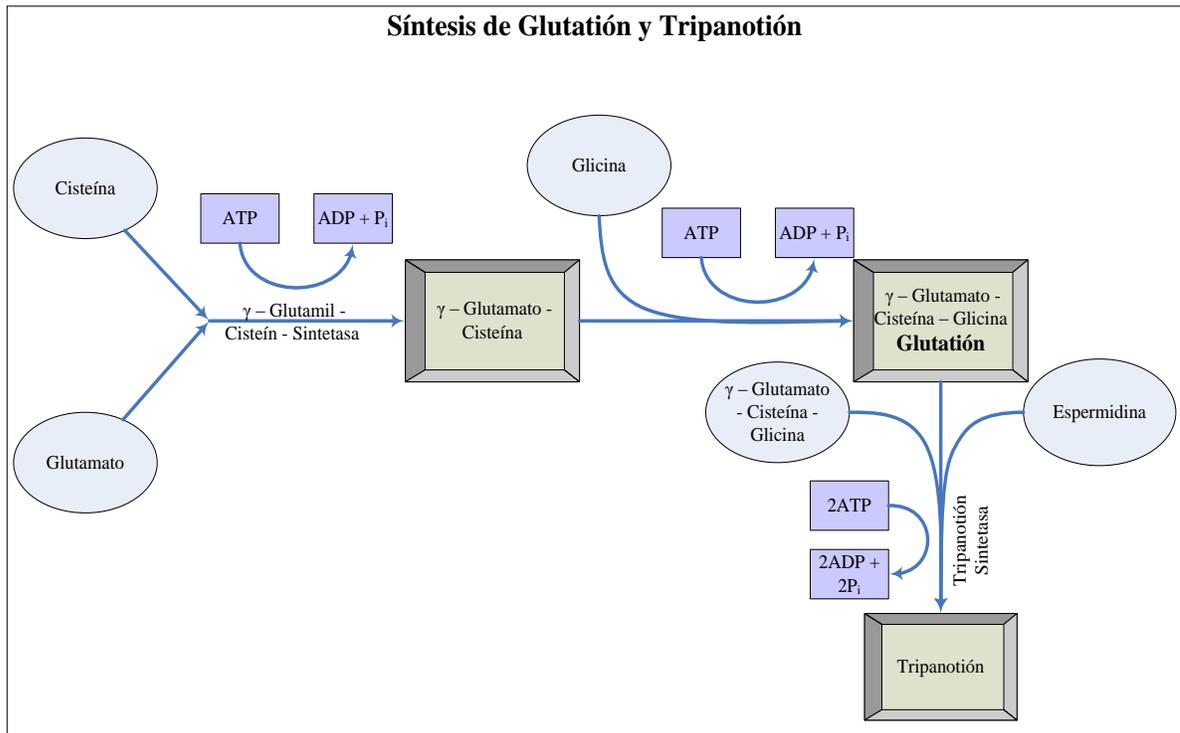


Figura 3. Síntesis de tioles en *Trypanosoma cruzi*.

En *T. cruzi* los niveles de glutión libre y conjugado son menores que en mamíferos. Los metabolitos electrofílicos de nifurtimox y benznidazol se conjugan con glutión y tripanotión, disminuyendo la concentración intracelular de estos tioles, lo que dejaría al parásito en condiciones precarias de defensa contra el estrés oxidativo y metabolitos electrofílicos (Maya y Morello, 2005).

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).

Adicionalmente se ha documentado variabilidad en la susceptibilidad entre cepas de *T. cruzi* para estos fármacos, lo que ha generado un elemento adicional que complica el manejo farmacológico de esta enfermedad, explicada por la diferencia en el contenido de glutión y tripanotión (Maya *et al.*, 2007).

Interacción con el hospedero

Las formas parasitarias ingresan a su hospedero cuando el individuo rompe su piel al rascarse el sitio de la mordida del triatomino o a través la de las membranas mucosas o conjuntival (Teixeira *et al.*, 2006).

La interacción hospedero–parásito se inicia con la adhesión del tripomastigote de *T. cruzi* a la superficie del macrófago, mediante moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPIs) (Previsto *et al.*, 2004), activando las señales necesarias para proceder con la invasión de la célula (Woolsey *et al.*, 2003; Andrade y Andrews, 2004). En este proceso se forma una vacuola compuesta por lisosomas, que contiene al parásito. La ruptura de esta vacuola, por acción de una proteína lítica dependiente de pH ácido, permite que el parásito escape al citosol donde se transforma en amastigote (Caler *et al.*, 2000; Rosestolato *et al.*, 2002; Vieira *et al.*, 2002; Andrade y Andrews, 2004). En el medio intracelular del macrófago, el amastigote toma muchos nutrientes, incluyendo espermidina, y se divide activamente.

Durante este proceso se activan vías dependientes de MAP quinasas (Ropert *et al.*, 2001), capaces de aumentar moderadamente la síntesis de óxido nítrico (NO) y de citoquinas proinflamatorias (Magez *et al.*, 1998) como interleukinas (ILs) 1, 6, 8, 12 y TNF- α . Estas dos últimas inducen la síntesis de interferon- γ (IFN- γ) en células NK (Une *et al.*, 2003).

Al prosperar la infección, se activan los macrófagos por medio de la IL-2 e IFN- γ , producidas por los linfocitos T helper (Fabrino *et al.*, 2004). Al mismo tiempo, en los macrófagos se induce la activación de la óxido nítrico sintetasa (iNOS) responsable del aumento en la producción de óxido nítrico (NO) que produce estrés oxidativo (Fabrino *et al.*, 2004) y que junto a las especies reactivas del oxígeno son importantes mediadores contra la invasión microbiana (Fabrino *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006) (fig. 4).

Los macrófago infectados con *T. cruzi* secretan TNF- α , el que induce induce apoptosis de linfocitos T o neutrófilos (Li *et al.*, 2006). Esto promueve una respuesta antiinflamatoria y permisiva para la infección que permite la proliferación del parásito (Waghabi *et al.*, 2005), porque la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por macrófagos infectados induce la producción de TGF- β y de prostaglandinas (Li *et al.*, 2006). En cambio, en macrófagos normales el

reconocimiento de las células apoptóticas por los fagocitos es muy importante en la mantención de la homeostasis, control de la respuesta inmune y resolución de la inflamación. La interacción y reconocimiento son gatillados por cambios en la superficie en las células apoptóticas, como la aparición de fosfatidilserina (PS) y calreticulina. Hay evidencias considerables que implican a la PS como un estímulo de los efectos antiinflamatorios o antiinmunogénicos (Freire de Lima *et al.*, 2006).

En este escenario de alteración en el funcionamiento del sistema inmune la importancia de las prostaglandinas radica en que tienen un efecto antiinflamatorio en macrófagos activados ya que disminuyen la proliferación celular y la producción de citoquinas proinflamatorias incluyendo a IL-10 y TNF- α . También aumentan la actividad de TGF- β , lo que a su vez disminuye el funcionamiento de la iNOS (Maya *et al.*, 2007). En consecuencia se favorece el crecimiento intracelular del *T. cruzi* (Freire de Lima *et al.*, 2000).

Ahora, la trascendencia de las variaciones en la concentración de óxido nítrico es que estaría involucrado en mecanismos de evasión de la respuesta inmune en la fase aguda, por ejemplo: 1) el aumento en la producción de NO, inducido por IFN- γ , promueve la apoptosis en los macrófagos y la proliferación intracelular del parásito, proceso durante el cual algunos parásitos sufren apoptosis (Maya *et al.*, 2007). 2) inducción de inmunosupresión del hospedero a través de procesos como la disminución de la actividad iNOS por medio de células mieloides inmaduras, inhibición de la síntesis de la IL-2 y disminución de su receptor IL-2R en células sanguíneas y aumento de la actividad de citoquinas antiinflamatorias, por ejemplo, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Maya *et al.*, 2007) (fig. 4).

Por su parte, el TGF- β disminuye la producción de óxido nítrico (NO) y de ión superóxido e inhibe la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en macrófagos activados contribuyendo con el balance antiinflamatorio (Li *et al.*, 2006; Freire de Lima *et al.*, 2006) (fig. 4). Esta actividad inhibitoria puede resolver la inflamación y prevenir el desarrollo de inmunopatologías (Li *et al.*, 2006).

Respecto del TGF- β , podemos decir que el factor de crecimiento transformante es un potente regulador de citoquinas con diversos efectos sobre células hemopoyéticas. Su función en el sistema inmune es mantener la tolerancia vía regulación de la proliferación de linfocitos, diferenciación y supervivencia. Se secreta como complejo latente y es activado por proteasas, integrinas, o trombospondinas específicas; el *T. cruzi* secreta proteasas que lo activan (Li *et al.*, 2006).

Existen tres isoformas homólogas en los mamíferos TGF- β 1, TGF- β 2 Y TGF- β 3, codificados por genes diferentes. TGF- β 1 es la isoforma predominante expresada en el sistema inmune, pero todas las isoformas tienen propiedades similares *in vitro* (Li *et al.*, 2006).

El TGF- β usa diferentes vías para inhibir la proliferación de linfocitos T, incluyendo la inhibición de la expresión de la citoquina mitogénica de células T (IL-2) vía supresión de la transcripción (Li *et al.*, 2006).

Las células apoptóticas vía TGF- β coordinan la producción de eicosanoides antiinflamatorios e inhiben a los proinflamatorios. La inducción de TGF- β es dependiente de arginasa y podría así limitar la producción de óxido nítrico, permitiendo la proliferación del parásito (Freire de Lima *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006).

De todo esto se desprende que el aumento en las concentraciones de TGF- β tiene efectos benéficos para el parásito, creándose así un círculo vicioso, ya que la prostaglandina E₂ (PGE₂) es capaz de inducir la producción de TGF- β en macrófagos expuestos a células apoptóticas (Fadok *et al.*, 1998) (fig. 4). A su vez, TGF- β es capaz de inducir la producción de PGE₂ en células inflamatorias no fagocíticas (Fong *et al.*, 2000).

Como consecuencia de todo este ambiente creado por el *T. cruzi*, la producción de prostaglandina E₂ estaría aumentada y como consecuencia de ello la actividad de arginasa y ornitina descarboxilasa (ODC) aumenta, lo que asociado a la disminución en la producción de NO, deja el “pool” de arginina libre para la síntesis de poliaminas en el macrófago (Freire de Lima *et al.*, 2000). Las poliaminas espermina y espermidina son esenciales para la proliferación y diferenciación celular, están involucradas en la síntesis de DNA, RNA y proteínas y en la estabilidad de membranas y el citoesqueleto. También se ha descrito cierto rol antioxidante y

propiedades de eliminación de radicales de oxígeno asociados a membrana en diferentes sistemas celulares, por ejemplo, la espermidina es un componente esencial del tripanotión (Hernández *et al.*, 2006) (fig. 4).

En la presente memoria se propone el uso *in vivo* de ácido acetilsalicílico (AAS), ya que disminuye las prostaglandinas en el macrófago, por inhibición de la ciclooxigenasa (COX), por lo tanto puede disminuir la actividad de ornitina descarboxilasa (Freire de Lima *et al.*, 2000), lo que conduciría a disminución en la capacidad de síntesis de T(SH)₂ en el *T. cruzi*. Por ello, la inhibición de COX con AAS es capaz, no solamente de bloquear la producción de PGE₂ sino también la de TGF-β (Freire de Lima *et al.*, 2000), aumentando la producción de TNF-α (Kim y Hahn, 2000) y facilitando la actividad antiparasitaria del macrófago. De hecho, la administración de ácido acetilsalicílico a ratones infectados con *T. cruzi*, y que además fueron inoculados con células apoptóticas, disminuyó la parasitemia de manera dependiente de la dosis (Freire de Lima *et al.*, 2000).

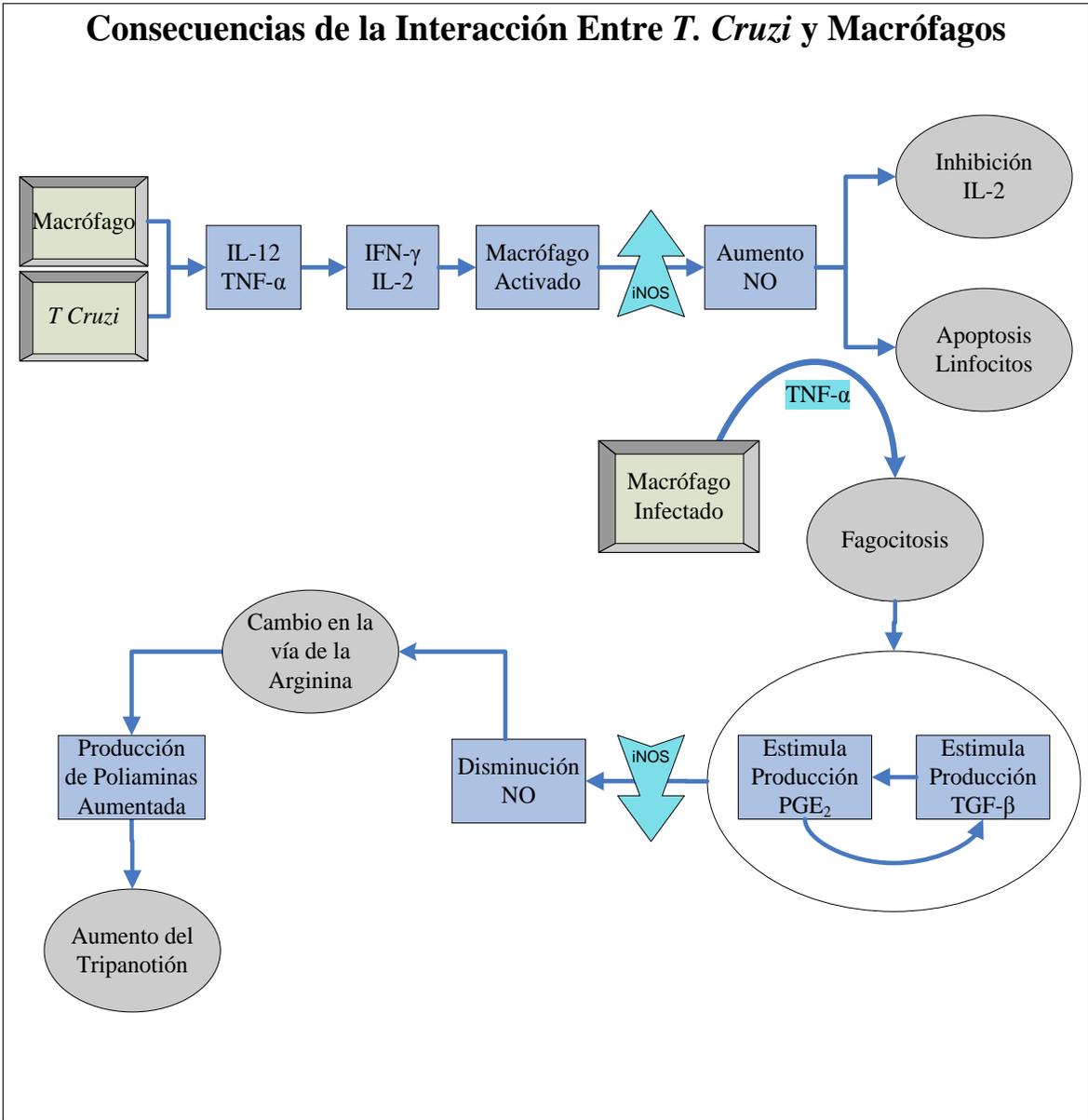


Figura 4. Interacción entre *T. cruzi* y macrófagos.

HIPÓTESIS

En ratones, el ácido acetilsalicílico y la butionina sulfoximina potencian el efecto tripanocida del nifurtimox.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el aumento de la actividad antichagásica de nifurtimox en presencia de ácido acetilsalicílico o butionina sulfoximina en ratones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto antichagásico de ácido acetilsalicílico, butionina sulfoximina y nifurtimox en ratones infectados con *T. cruzi*.
2. Evaluar el efecto antichagásico de las asociaciones de estos fármacos en ratones infectados con *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Materiales**

La cepa de parásito Dm28c se obtuvo de la colección de *T. cruzi* del Laboratorio de Farmacología y Bioquímica de Parásitos, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La L-Butionina sulfoximina (BSO) se obtuvo de Sigma Chemical Co.

El nifurtimox (Nx) y el ácido acetilsalicílico (AAS) se obtuvieron de laboratorios Bayer.

Los ratones provenían del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

- **Métodos**

Ratones

Se utilizaron ratones machos, de la cepa BALB/c de 4 a 6 semanas de edad, con un peso promedio de 20 ± 2 gramos, 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 Veterinaria, dentro del marco del proyecto FONDECYT 1020095.

Modelo de infección

Los ratones fueron inoculados intraperitonealmente con 30.000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Dm28c de *T. cruzi*, obtenidos desde ratones infectados anteriormente, y se dividieron aleatoriamente en grupos de 10 animales cada uno para la administración de los distintos tratamientos y controles.

Administración de drogas y selección de dosis a administrar en asociaciones

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 30 o 220 mg/kg cada una.

El AAS y el nifurtimox se disolvieron en el agua destilada y se administró en el agua de bebida de los animales *ad libitum*, habiendo determinado un volumen diario de 3 ml por ratón (volumen determinado de ingesta diaria en experimentos previos a esta investigación). En ese volumen se administraron dosis desde 5 a 200 mg/kg/día de AAS.

Todos los tratamientos fueron iniciados 24 horas post infección.

Para la elección de la dosis de nifurtimox a utilizar en la combinación se probaron diferentes dosis desde 0,1 a 10 mg/kg/día (todas estas dosis son consideradas subterapéuticas) y se compararon las supervivencias. Se observó que para 10 mg/kg/día existió un 100% de supervivencia, y con dosis no aumentó de manera significativa la supervivencia. Por esta razón la dosis seleccionada para evaluar el efecto de aumento o disminución de la actividad tripanocida de nifurtimox al combinarlo con 220 mg/kg/día de BSO fue de 2,5 mg/kg/día, porque los ratones tratados con esta dosis de nifurtimox mostraron una supervivencia muy baja respecto del grupo control, descartando así algún grado de enmascaramiento del efecto de la combinación.

En el caso de AAS 25 mg/kg/día las dosis a administrar fueron 0,1; 0,5 y 1 mg/kg/día de Nifurtimox, ya que estos valores se encontraban en el mismo rango de magnitud que la dosis a utilizar para la otra combinación.

Estudio de parasitemia

Luego de detectar la presencia de parásitos en sangre, que ocurre entre 4 a 5 días después de la infección, se comenzó a evaluar cuantitativamente las parasitemias por microscopía directa (examen de sangre fresca). Los ratones infectados sin tratamiento y

ratones infectados con tratamiento fueron monitoreados cada 24 ó 48 horas. En el caso de la combinación AAS-Nx se efectuaron las mediciones tratando de detectar los “peaks” de parasitemia. Se tomaron aproximadamente 50 μ l de sangre fresca de la punta de la cola de los animales infectados en un tubo de microhematocrito con heparina, el cual una vez sellado, se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm y se dejaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se extrajo el plasma y se hizo recuento microscópico del sobrenadante determinando el número de tripomastigotes por campo con un aumento de 40x. Se analizaron 10 campos por animal. Los resultados de la cantidad de parásitos obtenidos en cada día de estudio se expresaron como promedio de parasitemia del grupo, más la desviación estándar correspondiente.

Para determinar las diferencias entre las parasitemias de los grupos estudiados se utilizó el análisis de ANDEVA de dos vías post test Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Para los análisis estadísticos se utilizó el software Graphpad prism 4.0.

Supervivencia de animales infectados y tratados

Se analizó la tasa de supervivencia de los ratones determinando la mortalidad diariamente durante 20 días desde el inicio de los tratamientos.

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 log-rank (Urbina *et al.*, 2004), utilizando el software Graphpad prism 4.0, considerándose $p < 0,05$, como estadísticamente significativo. Todos los resultados se presentan como el promedio \pm DS de por lo menos tres experimentos independientes.

Estudios Histológicos

Los controles sanos se sacrificaron al término del experimento para la obtención de muestras histológicas de corazón. Con el mismo objetivo, los supervivientes a los tratamientos fueron sacrificados al término de los experimentos. Las muestras del grupo control infectado se obtuvieron desde los animales que lograron mayor tiempo de supervivencia. Los corazones fueron extraídos e inmediatamente suspendidos en una solución de formalina al 10% (fijación dentro de las 24 horas siguientes al sacrificio).

Posteriormente se realizó la inclusión de las muestras, según se describe a continuación:

Se aplicó una serie gradual de soluciones acuosas de menor a mayor de Alcohol Etilico. Iniciando con alcohol al 50 %, luego con una solución de 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y finalmente alcohol al 100 % para eliminar el agua. Luego de deshidratar el tejido, se pasó a una solución de Xilol.

Posteriormente los tejidos fueron incluidos en parafina se colocaron las muestras de tejido en un recipiente y se le agregó la parafina fundida a 60° C, colocando la muestra en una estufa por una hora, tres veces manteniendo la temperatura a 60° C.

Después se colocó la muestra y un poco de parafina fundida en un molde de papel o metal de forma rectangular y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Las muestras fueron cortadas en un micrótopo y montadas sobre un portaobjeto. La parafina se eliminó utilizando Xilol y posteriormente se rehidrató haciéndola pasar por una serie de graduaciones decrecientes de alcohol etílico hasta llegar a una solución 100% de agua.

Posteriormente se sumergieron los portaobjetos con las muestras en solución de hematoxilina durante 5 minutos y posteriormente en solución de eosina por 5 minutos. Una vez teñido, se deshidrató nuevamente y se fijó con el cubreobjetos utilizando bálsamo de Canadá.

Con las muestras así procesadas se determinó la presencia de miocarditis y parásitos en los tejidos, y se realizó una comparación con el control y entre los tratamientos.

RESULTADOS

Efecto de la butionina sulfoximina sobre las parasitemias y supervivencia de ratones BALB/c, infectados con *T. cruzi*, cepa Dm28c

El efecto de la administración de dos dosis de BSO (30 y 220 mg/kg/día) en la parasitemia se presenta en la figura 5. La evaluación de la parasitemia en los grupos tratados con BSO mostró diferencias significativas en relación al control, en casi todos los puntos ($p < 0,001$).

En paralelo, se analizó la supervivencia de los ratones infectados tratados y no tratados (control) (fig. 6), determinándose que hubo un aumento de la supervivencia desde un 25% a un 80% para la dosis de 220 mg/kg/día de BSO, indicando que a esta dosis existiría un efecto tripanocida reflejado tanto en las parasitemias como en la supervivencia de los ratones. Cabe señalar que BSO, a dosis de 30 mg/kg/día no presentó efectos significativos en la tasa de supervivencia; sin embargo, disminuyó la parasitemia en forma significativa.

La figura 7 es una muestra representativa de las microfotografías de cortes histológicos de miocardio de ratones sanos (fig. 7.1), ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con agua (fig. 7.2) y ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con BSO (fig. 7.3). Se observó en los ratones infectados y tratados con agua la aparición de nidos de amastigotes (destacados en la figura) y de una gran cantidad de infiltrado inflamatorio crónico (linfocitos), situación que tiende a disminuir por efecto del BSO en dosis alta

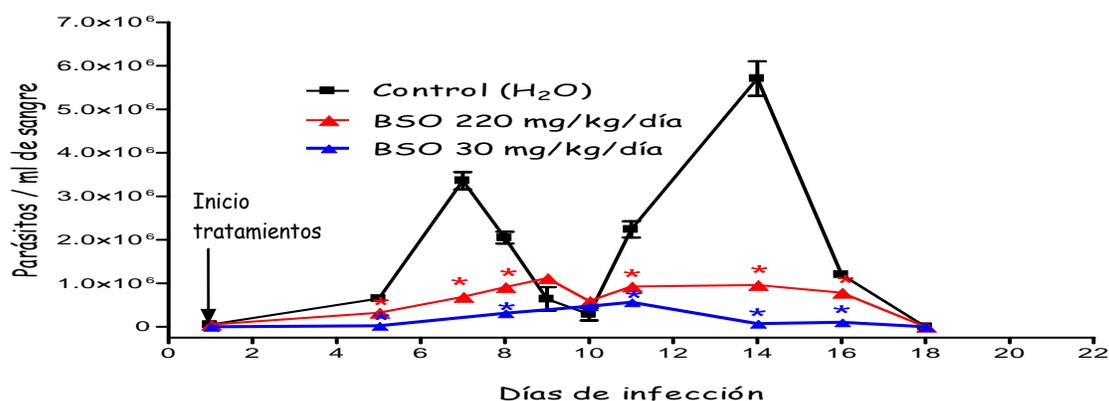


Figura 5. Evolución de las parasitemias de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c y tratados con BSO 30 y 220 mg/kg/día. Las parasitemias se evaluaron cada 24 ó 48 horas. Se obtuvo diferencias significativas en casi todos los puntos de la curva para ambas dosis de BSO en relación al control, los que se marcaron con * cuando $p < 0,001$. Datos analizados por ANDEVA de dos vías post test Bonferroni.

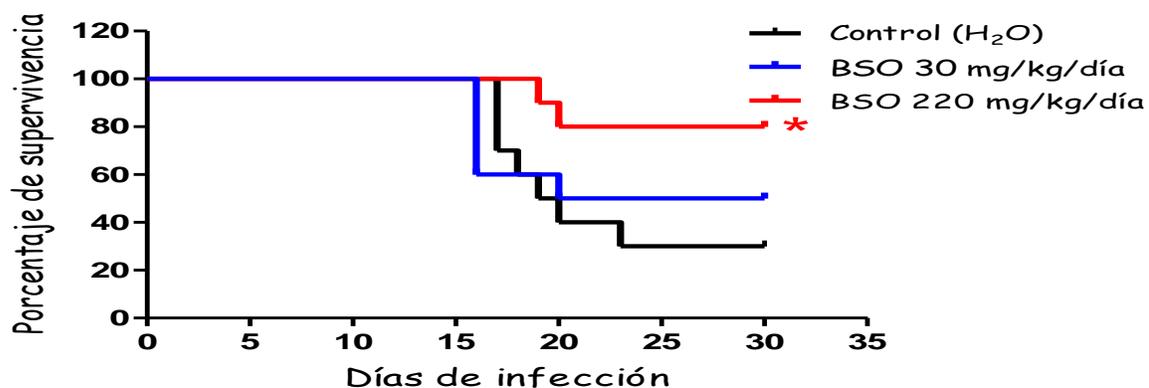
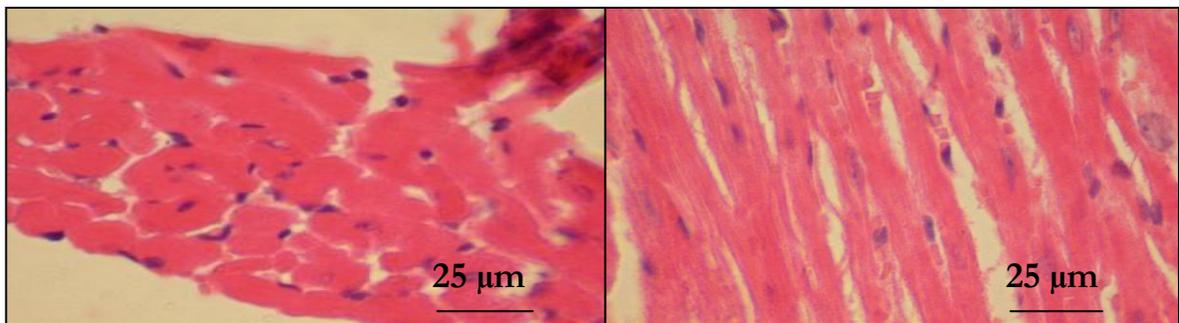
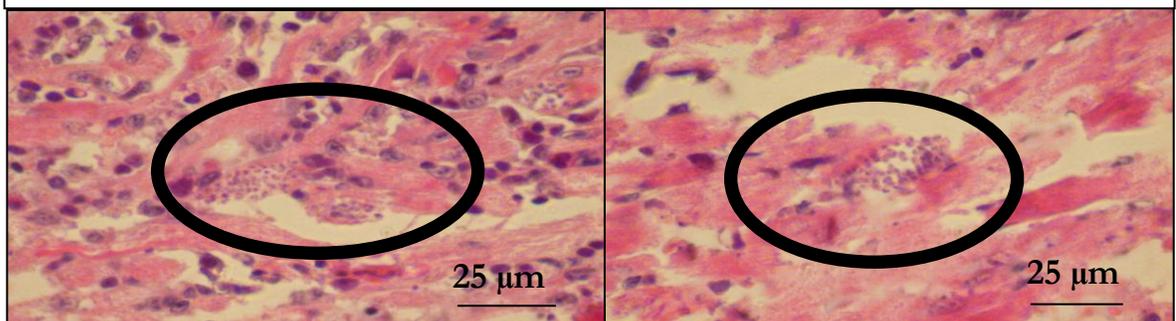


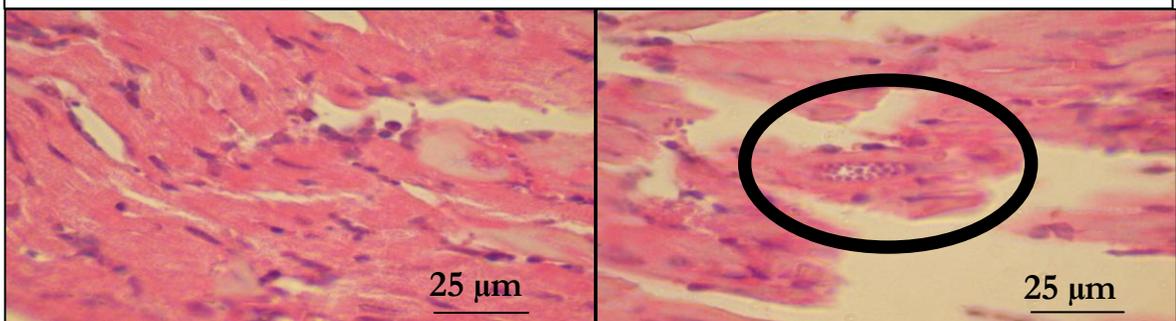
Figura 6. Efecto de BSO 30 y 220 mg/kg/día sobre la Curva de supervivencia en ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c. Estos resultados fueron analizados mediante las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, test de Log-rank, y las diferencias respecto al control fueron consideradas significativas a niveles de $p < 0,05$ (indicada en la figura con *), en el caso de BSO 220 mg/kg/día el valor de $p = 0,0199$.



7.1 microfotografías de tejido miocárdico de ratones sanos, con tinción hematoxilina-eosina, tratados con agua.



7.2 microfotografías de tejido miocárdico de ratones, con tinción hematoxilina-eosina, infectados con tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c vía, intraperitoneal, tratados sólo con agua. En la figuras se marcan con círculos los nidos de amastigotes.



7.3 microfotografías de tejido miocárdico de ratones, con tinción hematoxilina-eosina, infectados intraperitonealmente con *T. cruzi*, clon Dm28c, tratados con 220 mg/kg/día de BSO y supervivientes a la infección. Con un círculo se marca la presencia de nidos de amastigotes.

Figura 7. Efecto de BSO sobre tejido miocárdico de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c.

Efecto de la asociación de nifurtimox y BSO sobre ratones BALB/c, infectados con *T. cruzi*, cepa Dm28c

Como se puede observar en la figuras 8 y 9 la combinación de Nx (dosis que produjo la menor supervivencia, 2,5 mg/kg/día) con BSO disminuye significativamente las parasitemias respecto al grupo control y al tratamiento de nifurtimox solo.

En cuanto a las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (fig. 10), podemos observar un notable aumento de la supervivencia de los animales al combinar Nx + BSO, respecto al control y a la curva de Nx solo, lo que indicaría que BSO aumenta la actividad tripanocida de Nx. Cuando se hizo la comparación entre Nx y Nx + BSO hubo diferencias significativas con un valor de $p= 0,0043$ (dato no mostrado).

La figura 11 muestra las fotografías de cortes de miocardio de ratones infectados con 30000 tripomatigotes *T. cruzi*, clon Dm28c, que recibieron los siguientes tratamientos: Nx 2,5 mg/kg/día y la combinación Nx + BSO 220 mg/kg/día. Se puede observar que los nidos de amastigotes y el infiltrado inflamatorio crónico (linfocitos) tiende a disminuir con la combinación Nx + BSO (fig. 11.2) respecto de Nx solo (fig. 11.1), lo que estaría de acuerdo con la disminución en las parasitemias y el aumento de la supervivencia. Las fotografías son de cortes histológicos representativos, pues se analizaron más de tres cortes por ratón y se evaluaron todos los ratones de la cohorte.

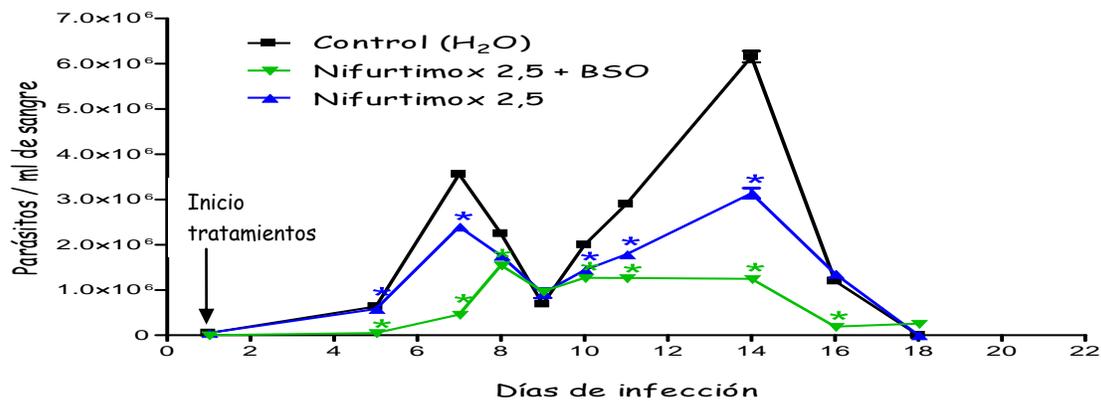


Figura 8. Evolución de las parasitemias de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c y tratados con nifurtimox 2,5 mg/kg/día solo y asociado a BSO 220 mg/kg/día. Las parasitemias fueron evaluadas cada dos días. Los datos fueron analizados por ANDEVA de dos vías post test Bonferroni, y se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Cuando $p < 0,001$ se señala como *.

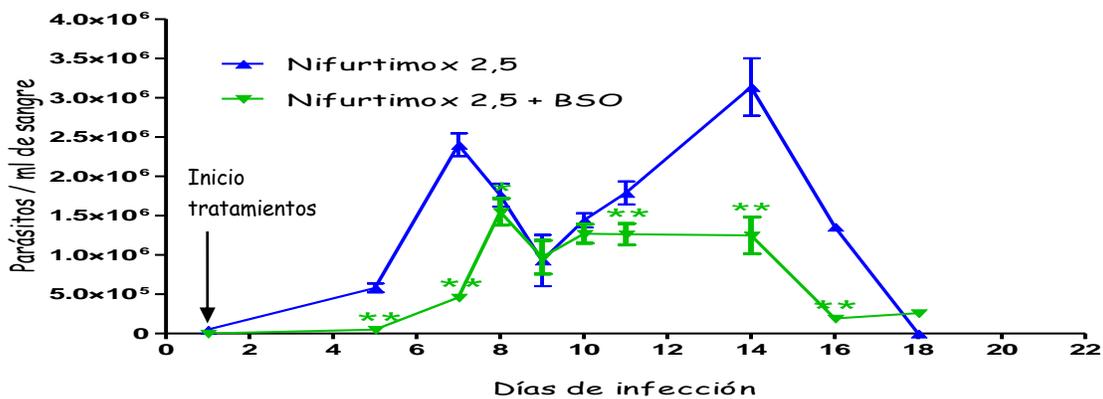


Figura 9. Comparación de la evolución de las parasitemias de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c tratados con nifurtimox 2,5 mg/kg/día respecto a su asociación a BSO 220 mg/kg/día. Las parasitemias fueron evaluadas cada dos días. Los datos fueron analizados por ANDEVA de dos vías post test Bonferroni, y se consideró significativo un valor de $p < 0,05$ (*). Cuando $p < 0,001$ se señala como **.

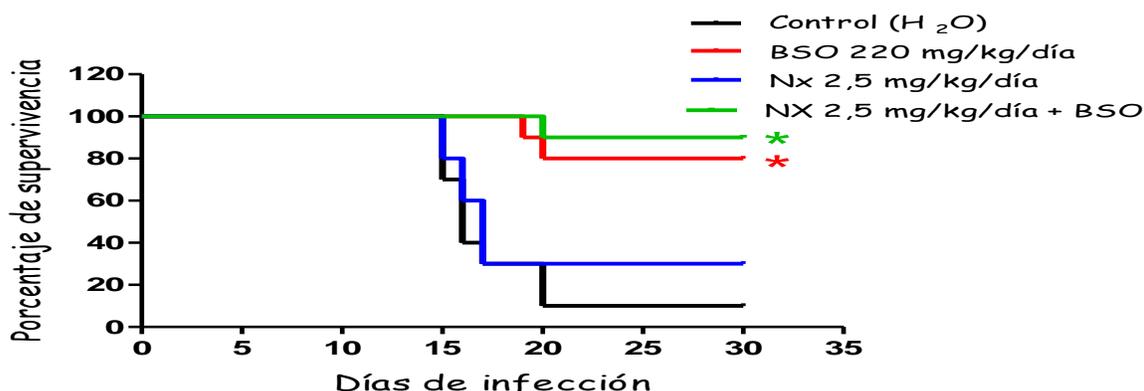


Figura 10. Efecto de BSO 220 mg/kg/día, nifurtimox 2,5 mg/kg/día y la combinación nifurtimox + BSO sobre la curva de supervivencia en ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c. El análisis estadístico fue realizado mediante las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, test de Log-rank. Las diferencias se consideraron significativas a niveles de $p < 0,05$. Se compararon los diferentes tratamientos con el control, resultando para BSO 220 mg/kg/día $p = 0,0007$ (*), Nx 2,5 mg/kg/día $p = 0,3589$, Nx + BSO $p = 0,0002$ (*).

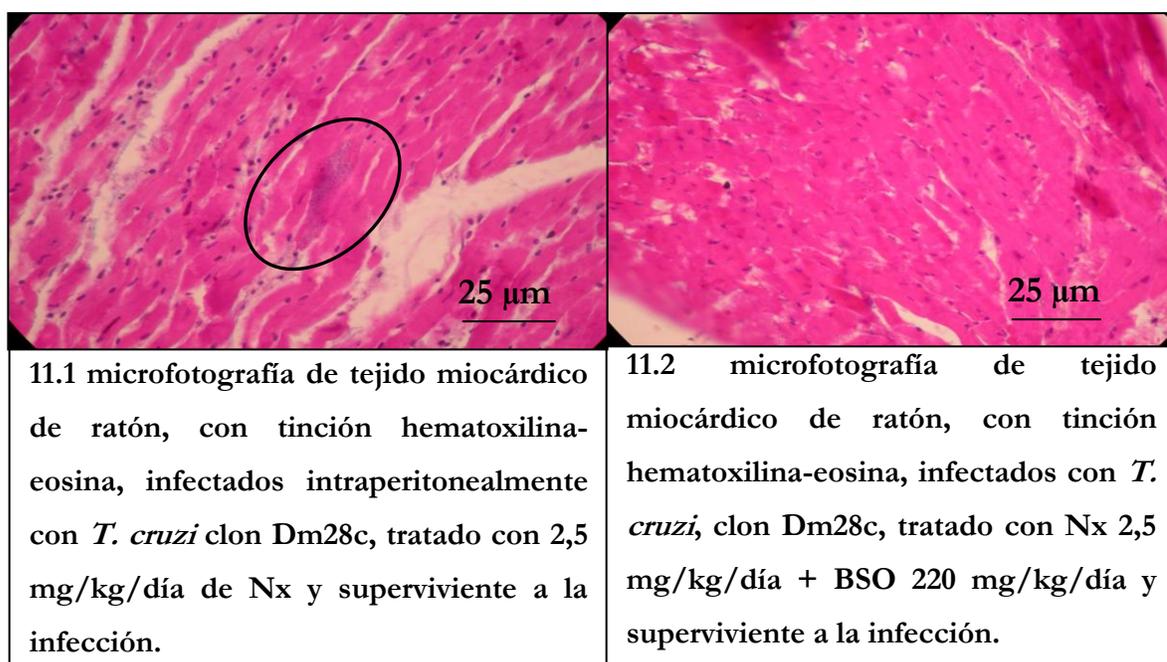


Figura 11. Comparación del efecto de nifurtimox 2,5 mg/kg/día y su combinación con BSO 220 mg/kg/día sobre tejido miocárdico de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c. El círculo indica un nido de amastigotes.

Efecto del ácido acetilsalicílico sobre las parasitemias de ratones BALB/c, infectados con *T. cruzi*, cepa Dm28c

En la figura 12 se puede observar diferencias significativas en algunos puntos de las curvas de parasitemias para cada uno de los grupos tratados con AAS, mediante análisis de ANDEVA de dos vías test Bonferroni. Se observa una mayor diferencia en las parasitemias de los grupos tratados con AAS 25 y 50 mg/kg/día (fig. 12 A y B, respectivamente) respecto al control, lo que concuerda con el aumento de la supervivencia (fig. 13). En cuanto a la dosis de AAS 100 mg/kg/día (fig. 12 C) se observa sólo en algunos puntos diferencias respecto al control, lo que coincide con un aumento en la supervivencia de los ratones, no difiriendo estadísticamente respecto al control (fig. 13).

Para evaluar la supervivencia de ratones infectados con *T. cruzi*, y tratados con AAS se administraron dosis de 5, 10, 25, 50, 75, 100 y 200 mg/kg/día de AAS y se realizó un gráfico en el que se representa el porcentaje de supervivencia al cabo de 20 días de tratamiento (fig. 13), en el que se observa que la curva dosis efecto iría en forma ascendente hasta 25 mg/kg/día de AAS (60% de supervivencia), desde ahí comenzarían a disminuir las supervivencias, tanto que para los ratones que recibieron las dosis mayores de AAS (100 y 200 mg/kg/día) las supervivencias son comparables a AAS 5 mg/kg/día; esto es como si se cruzaran dos curvas en las que el punto óptimo o de encuentro sería AAS 25 mg/kg/día. Al mismo tiempo, se confeccionó una curva de supervivencia de Kaplan-Meier, test de Log-rank, que muestra la evolución en el tiempo de las supervivencias y las compara estadísticamente, las dosis de 25 y 50 mg/kg/día de AAS mostraron diferencias significativas respecto al control. Para la dosis de AAS 100 mg/kg/día se produjo un incremento en la supervivencia muy leve, lo que no fue estadísticamente significativo.

La figura 14 muestra fotografías representativas de cortes de miocardio teñidos con hematoxilina-eosina de ratones infectados con *T. cruzi* y ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con diferentes dosis de AAS 25, 50 y 100 mg/kg/día. El AAS a bajas dosis (25 y 50 mg/kg/día) mostró una importante disminución de la carga parasitaria y reclutamiento de células inflamatorias, sin embargo a mayores dosis no se observaron diferencias notorias respecto al control.

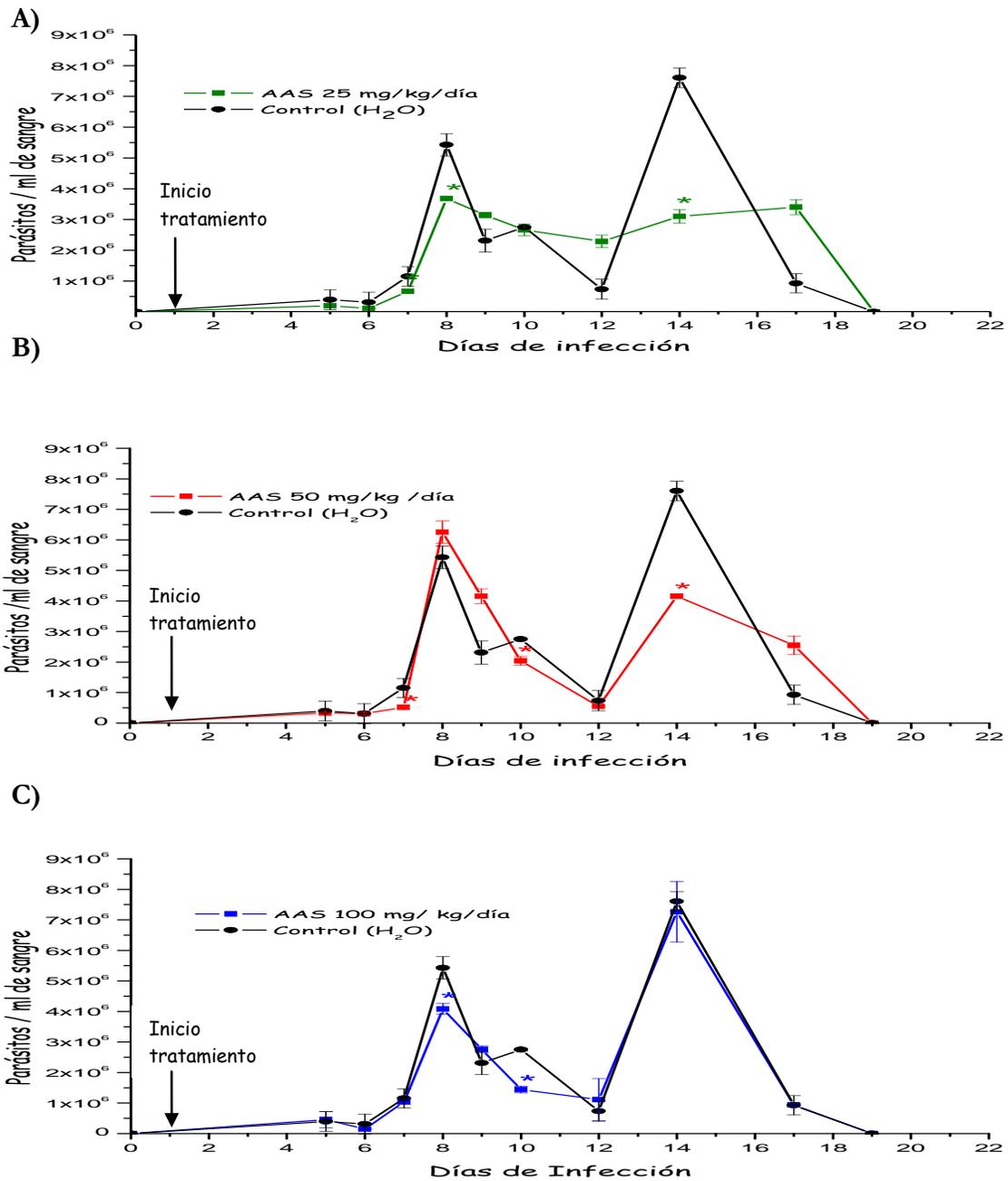


Figura 12. Evolución de las parasitemias de ratones BALB/c infectados con 30000 de *T. cruzi*, clon Dm28c y tratados con 25 (A), 50 (B) y 100 (C) mg/kg/día de ácido acetilsalicílico. Las parasitemias se evaluaron diariamente, las diferencias se consideraron significativas a niveles de $p < 0,05$, se marcaron con * los puntos en que $p < 0,001$, según el análisis de ANDEVA de dos vías test Bonferroni.

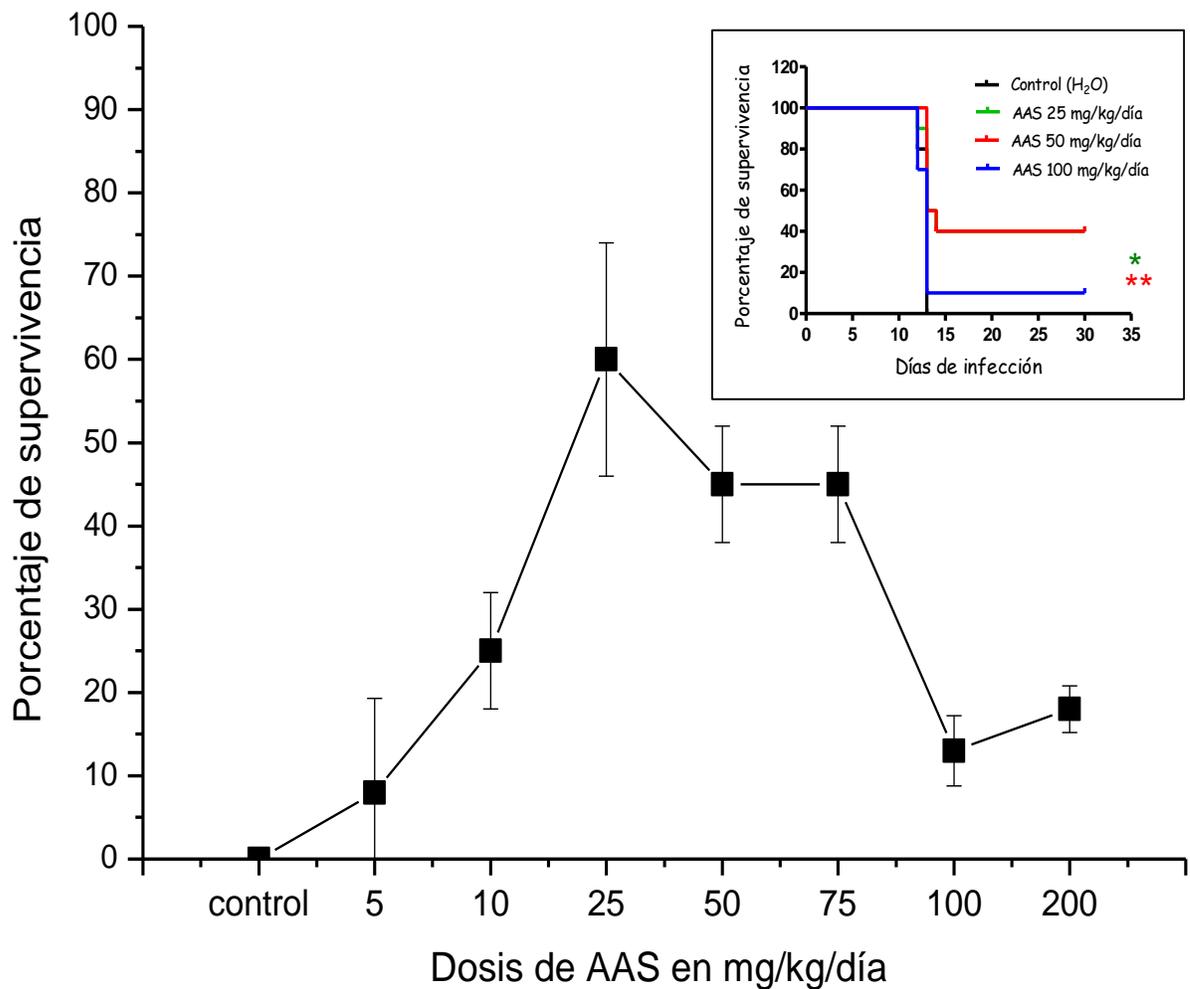
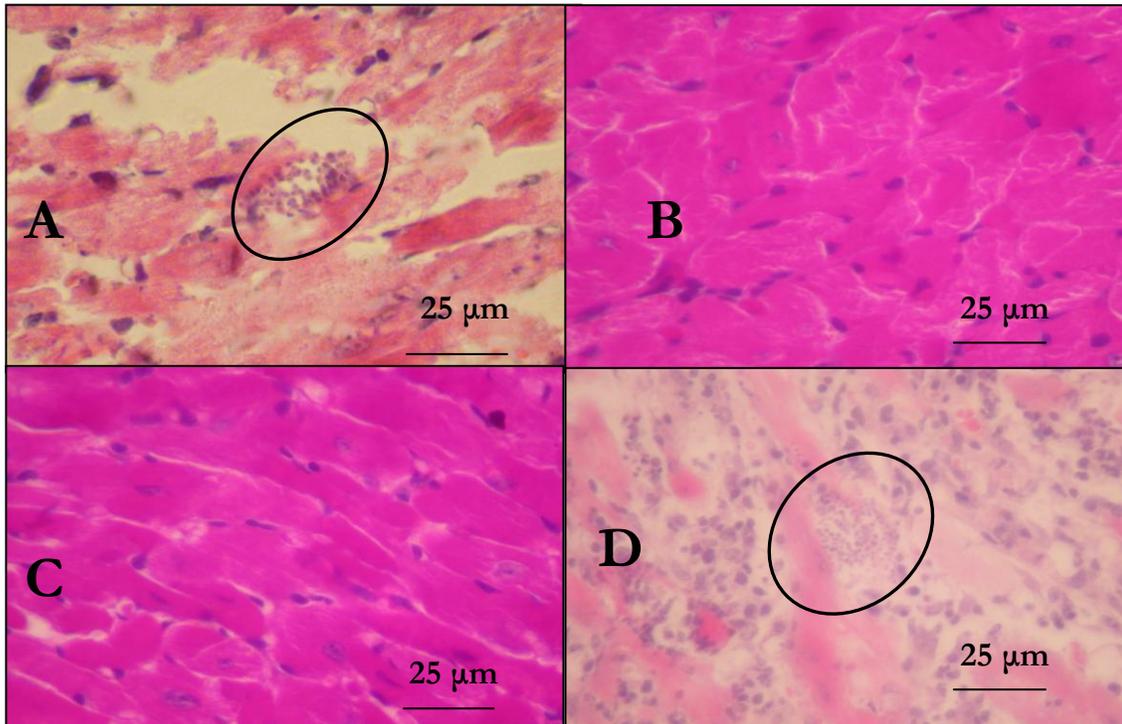


Figura 13. Efecto en la supervivencia de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c y tratados con 5, 10, 25, 50, 75, 100 y 200 mg/kg/día de ácido acetilsalicílico. El porcentaje de supervivencia corresponde al número de ratones que sobreviven al cabo de 20 días de infección y tratados con las dosis de AAS. A su vez, el gráfico del inserto representa el análisis de la supervivencia mediante las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, donde las diferencias fueron consideradas significativas a niveles de $p < 0,05$. Las dosis que mostraron diferencias significativas respecto al control en toda la curva fueron 25 mg/kg/día con un valor de $p = 0,0243$ (*), y AAS 50 mg/kg/día con un $p = 0,0068$ (**).



En esta figura se observan microfotografías de miocardio de ratones BALB/c con tinción hematoxilina-eosina, infectados intraperitonealmente con *T. cruzi* clon Dm28c a los que se les aplicaron diferentes tratamientos. La sección A corresponde a un ratón control al que se le dio sólo agua de bebida como tratamiento, las zonas B, C y D corresponden a las dosis de 25, 50 y 100 mg/kg/día de AAS respectivamente (ratones supervivientes). Con un círculo se marca la presencia de amastigotes.

Figura 14. Efecto del ácido acetilsalicílico sobre tejido miocárdico de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c.

Efecto de nifurtimox y su asociación con AAS sobre ratones BALB/c, infectados con *T. cruzi*, cepa Dm28c

Para la evaluación del efecto *in vivo* de de nifurtimox y su asociación con AAS, se infectaron ratones de la cepa BALB/c con 30000 tripomastigotes sanguíneos, cepa Dm28c de *T. cruzi* y se dividieron aleatoriamente en grupos de 10 animales cada uno. Transcurridas 24 horas post inoculación intraperitoneal de parásitos se comenzaron a administrar los tratamientos con nifurtimox a dosis de 0,1; 0,5 y 1 mg/kg/día (todas dosis subterapéuticas) y sus respectivas asociaciones con AAS 25 mg/kg/día, administradas como se describe en materiales y métodos. Al evaluar las parasitemias se observó diferencias significativas en algunos puntos de las curvas de Nx y Nx + AAS respecto al control (fig. 15 y 16). Todos los grupos que recibieron la combinación AAS + Nx mostraron diferencias significativas en la sección donde se ubica el “peak” de parasitemia de la curva del grupo control, pero tan sólo en las combinaciones de AAS con 0,1 y 1 mg/kg/día de nifurtimox mantuvieron sus niveles de parasitemia sin mayores variaciones, casi a niveles basales. De esto se desprende que la combinación de las drogas tendría un mayor efecto sobre las parasitemias que el uso de las drogas por sí solas.

En cuanto a las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (fig. 17), podemos apreciar que las concentraciones de nifurtimox que difieren del control fueron 0,1 y 1 mg/kg/día, pero la menor dosis de Nx sólo retrasa la fecha de muerte de los individuos. Respecto de la curva AAS + Nx (fig. 18), se observan diferencias sólo en las combinaciones de AAS 25 mg/kg/día con nifurtimox 0,1 y 1 mg/kg/día. Cuando se compararon las curvas de AAS + Nx v/s AAS solo no hubo diferencias; lo mismo ocurrió al comparar las combinaciones respecto a nifurtimox solo. Por lo tanto, lo que observamos en la combinación con la dosis menor de Nx correspondería al efecto de AAS 25 y en cuanto a la combinación de AAS 25 con la dosis mayor de nifurtimox, visualizamos el efecto de este último solo. Por lo que, en cuanto a la supervivencia, no se observó incremento de la actividad tripanocida de nifurtimox al combinarlo con AAS.

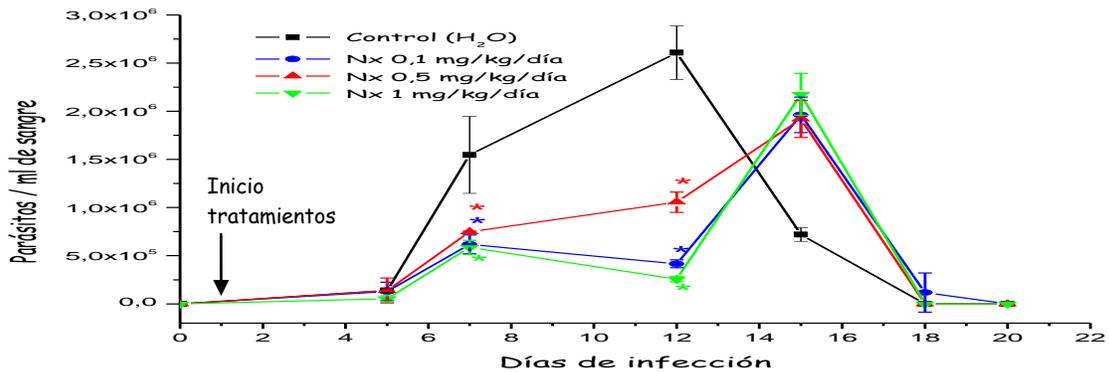


Figura 15. Evolución de las parasitemias de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c y tratados con 0,1; 0,5 y 1 mg/kg/día de nifurtimox. Las parasitemias se evaluaron buscando los “peaks” de la curva. Se obtuvo diferencias significativas respecto al control que se marcaron con * cuando $p < 0,001$; según el análisis de ANDEVA de dos vías test Bonferroni.

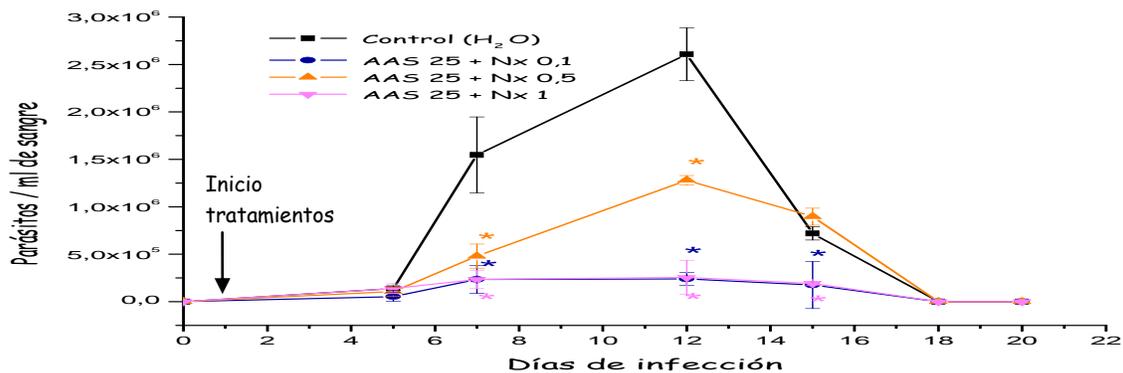


Figura 16. Evolución de las parasitemias de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c tratados con AAS 25 mg/kg/día combinada con nifurtimox 0,1; 0,5 y 1 mg/kg/día. Las parasitemias se evaluaron buscando los “peaks” de la curva. Se obtuvo diferencias significativas respecto al control que se marcaron con * cuando $p < 0,001$; según el análisis de ANDEVA de dos vías test Bonferroni.

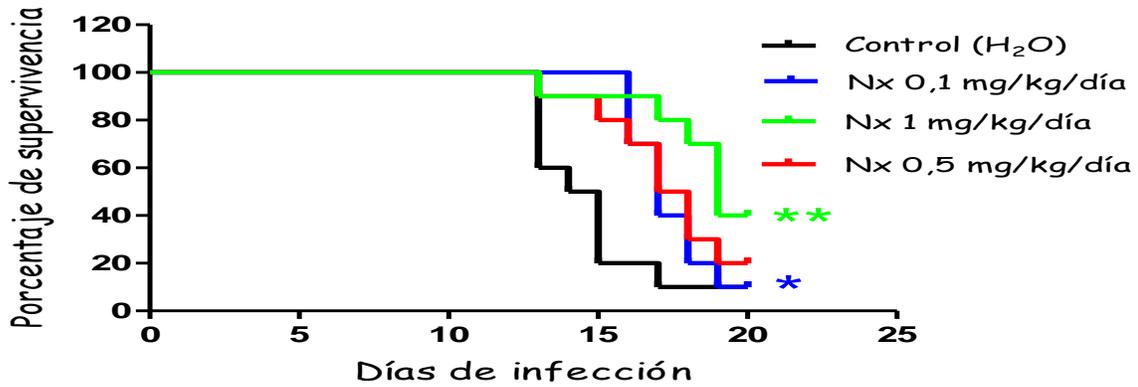


Figura 17. Efecto sobre la supervivencia de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c tratados con 0,1; 0,5 y 1 mg/kg/día de nifurtimox. El análisis estadístico fue realizado mediante las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, test de Log-rank. Las diferencias se consideraron significativas respecto al grupo control a niveles de $p < 0,05$ (* en la figura), para menores valores de p se simboliza con ** cuando $p < 0,01$. Para el caso de 1 mg/kg/día de Nx se obtuvo un valor de $p = 0,0071$, y para 0,1 mg/kg/día de Nx $p = 0,0391$.

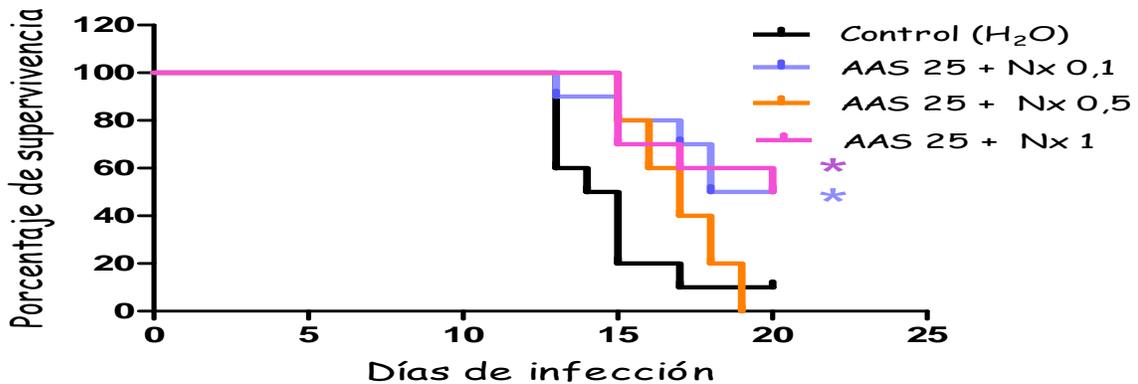


Figura 18. Efecto sobre la supervivencia de ratones BALB/c infectados con 30000 tripomastigotes de *T. cruzi*, clon Dm28c tratados con ácido acetilsalicílico combinado con 0,1; 0,5 y 1 mg/kg/día de nifurtimox. El análisis estadístico fue realizado mediante las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, test de Log-rank. Las diferencias se consideraron significativas a niveles de $p < 0,05$, en la figura se simboliza con * cuando $p < 0,01$. Se comparó los diferentes grupos respecto al control, resultando que fueron diferentes al control el grupo AAS + Nx 0,1 con un valor de $p = 0,0095$ y el grupo de AAS + Nx 1 con un $p = 0,0086$.

DISCUSIÓN

En términos de salud pública e impacto económico, se puede decir que la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es segunda la infección parasitaria más importante en América Latina, después de la malaria (Miles, 2003).

Actualmente las drogas utilizadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el nifurtimox y el benznidazol, tratamientos que son considerados insatisfactorios porque no detiene las lesiones progresivas del corazón ni del tracto digestivo en pacientes crónicos (Teixeira *et al.*, 2006). Además poseen efectos indeseables que frecuentemente llevan a la interrupción de la terapia (Castro *et al.*, 2006). Estas razones hacen necesario un tratamiento de mayor eficacia y con menor cantidad de efectos colaterales que las drogas convencionales.

Por todo esto se han probado numerosas y variadas drogas de origen natural y sintético, que incluye desde inhibidores de la síntesis del ergosterol hasta alopurinol, pero ninguna ha dado resultados superiores a los de nifurtimox y benznidazol, ya sea por problemas de insensibilidad, resistencia, toxicidad o eficacia clínica (Maya *et al.*, 2007).

Consecuentemente, en esta tesis intentamos aumentar la actividad tripanocida de nifurtimox al combinarlo con butionina sulfoximina o ácido acetilsalicílico.

Se evaluaron diferentes dosis de nifurtimox con el fin de identificar las concentraciones terapéuticas óptimas y también las subterapéuticas, pues estas últimas son las requeridas para los ensayos de combinación a fin de no enmascarar el efecto de la combinación por la acción plena del nifurtimox.

La butionina sulfoximina bloquea la enzima γ glutamil cisteinil sintetasa, disminuyendo el nivel de glutatión y tripanotión existentes en *T. cruzi*. Esta disminución de tioles no es dañina para el parásito en un medio ambiente inocuo. El problema surge cuando el parásito es sometido a algún tipo de estrés, como en el caso de la administración de nifurtimox, pues no es capaz de defenderse de esta agresión oxidativa. En este sentido es esperable que BSO no tenga un efecto significativo contra el parásito en cultivos axénicos o en el medio intracelular ya que en este caso, la célula proporciona un medio ambiente reductor (Faúndez *et al.*, 2005).

A su vez, y de manera inesperada, se encontró un efecto tripanocida del BSO *in vivo*. Las razones que explican esta observación son desconocidas. De manera especulativa, podría deberse a que dentro de un organismo multicelular, como en el caso de los ratones, existen múltiples factores que estarían estresando al parásito, como por ejemplo el sistema inmune, la presión de la reproducción intracelular y los procesos de liberación de tripomastigotes, y otros factores metabólicos que no se pueden apreciar en sistemas tan simples como en cultivos celulares.

Al ocupar el doble de la dosis de BSO que tuvo grandes efectos sobre la supervivencia (440 mg/kg/día), se observó una diferencia, pero esta no fue significativa, ya que lo más probable es que la supervivencia alcanzada por esta última dosis sea la máxima posible.

Entonces, se puede aumentar la actividad tripanocida de nifurtimox si se asocia con BSO, ya que se está incrementando el estrés oxidativo y al mismo tiempo modulando la respuesta inmunológica innata que existe contra él (Comini *et al.*, 2004). Esto se condice con lo ocurrido al analizar los resultados obtenidos, en los que por un lado disminuye los niveles de parasitemia de manera significativa con respecto a nifurtimox solo, y además aumenta los niveles de supervivencia de manera significativa, observándose también una disminución de los nidos de amastigotes y del tejido inflamatorio en los cortes histológicos. Todo esto va de acuerdo a lo encontrado *in vitro*, en el laboratorio, respecto a la potenciación del efecto tripanocida de nifurtimox y benznidazol al combinarlos con BSO (Faúndez *et al.*, 2005). Por lo tanto, el uso de BSO en combinación con nifurtimox podría disminuir la dosis de droga necesaria para obtener el mismo efecto clínico y como consecuencia, podría disminuir los efectos colaterales y/o la duración de la terapia.

Por otro lado, el ácido acetilsalicílico actúa por inhibición de la COX. En consecuencia, la producción de PGE₂ disminuye produciendo así un detrimento en la producción de TGF- β , lo que provocaría una disminución en la proliferación del parásito (Freire de Lima *et al.*, 2000). En este trabajo se observó que AAS disminuye las parasitemias, los nidos de amastigotes y la cantidad de tejido inflamatorio en el miocardio y aumenta la supervivencia de los individuos, al utilizar dosis tan bajas como 25 y 50 mg/kg/día de AAS, iniciando los tratamientos 24 horas post infección. Lo anterior concuerda con lo descrito por

Freire de Lima *et al.*, el año 2000 respecto a la disminución de las parasitemias al tratar ratones con 100 mg/kg/día de AAS.

Se puede concluir entonces que AAS aumenta el efecto tripanocida de nifurtimox, al actuar por la vía anteriormente señalada. Para ello se combinaron dosis muy pequeñas de nifurtimox con AAS para así apreciar realmente la existencia de un aumento del efecto tripanocida de nifurtimox. Al combinar las drogas ocurrió algo inesperado, ya que pese a existir disminución en las parasitemias y un aumento en la supervivencia con la combinación respecto del grupo control, los efectos fueron menores que cuando se utilizaron las drogas por sí solas. Lo anterior se contrapone a resultados *in vitro* recientemente obtenidos en el laboratorio, en los que se observó aumento del efecto tripanocida de nifurtimox en células RAW 264.7 infectadas con *T. cruzi* al asociarlo a AAS. Es posible plantear que las concentraciones de las drogas utilizadas en esta tesis no eran las adecuadas, razón por la que se sugiere efectuar un análisis por isoblograma, que indica la dosis óptima a utilizar en las combinaciones. El principal problema que se presenta con este enfoque, es colocar un criterio que refleje adecuadamente el efecto potenciador de la combinación usando el menor número posible de animales. Posiblemente fijando criterios de supervivencia se solucione este problema.

Se ha observado que en el proceso fisiopatológico de la enfermedad de Chagas, la producción de tromboxano A₂ cumple un rol importante. Se ha demostrado que el tromboxano es producido por el propio parásito y el bloqueo de su efecto en ratones “knock out” para el receptor provoca aumentos importantes en la parasitemia (Ashton *et al.*, 2007). Sin embargo, también existe evidencia de lo contrario, es decir, que la modulación de la actividad de COX en ratones infectados con *T. cruzi*, previene algunas manifestaciones de la enfermedad (Michelin *et al.*, 2005). En relación a esto, también se ha reportado que metabolitos de la COX y el NO contribuyen tanto a los efectos protectores como a los patológicos en infecciones experimentales por *T. cruzi*. La diferencia depende sólo del tiempo en el que ocurren los incrementos de sus concentraciones. En cepas de ratones resistentes a la enfermedad, el aumento en la producción de estas sustancias sería más temprano que en cepas sensibles como los BALB/c (Cardoni y Antúnez, 2004). Por otra parte se ha observado que al administrar indometacina en otras cepas de ratones infectados con *T. cruzi*, la inhibición de la síntesis de prostaglandinas no reduce la parasitemia e incrementa la mortalidad, por lo que se

sugiere una relación con altos niveles de TNF- α (Pinge-Filho *et al.*, 1999). Lo anterior se contrapone al observar que en ratones BALB/c tratados con meloxicam o salicilato de sodio, la producción de TNF- α fue inhibida, lo que podría deberse al uso de diferentes cepas de ratones (Michelin *et al.*, 2005).

Por otro lado, la inhibición de COX tiene efectos sobre la parasitemia y la supervivencia en ratones infectados con *T. cruzi*. Sin embargo aún no está claro, si esta inhibición está relacionada con el subtipo de COX inhibida. Por un lado, Abdalla *et al.* (2008) demostraron que la inhibición de la producción de PGE₂ disminuye las parasitemias, infiltrado inflamatorio y fibrosis cardíaca. Pero por otra parte, Hideko *et al.* (2008) observaron que el AAS es superior a inhibidores de COX2 y COX1/COX2 respecto a su efecto sobre las parasitemias pero no afectó la supervivencia. Lo anterior aparentemente, se deba al aumento de NO.

En este sentido el aporte que entregan los resultados es demostrar que, a dosis bajas, el ácido acetilsalicílico mejora algunos aspectos de la cardiopatía chagásica e influye favorablemente sobre la parasitemia, además de aumentar la supervivencia de los ratones. Por esto mismo, es lógico suponer que la inhibición parcial de la producción de tromboxano explicaría este efecto favorable. Y por el contrario, a dosis más altas de AAS la inhibición de tromboxano se profundizaría, explicando la pérdida del efecto benéfico observado a bajas dosis. Es por esta razón que la combinación de dos mecanismos distintos puede tener un efecto más favorable sobre la enfermedad de Chagas.

CONCLUSIONES

- La butionina sulfoximina demostró, por sí sola, tener efecto tripanocida, evidenciado por la disminución en las parasitemias, la inflamación del músculo cardíaco y el aumento en las supervivencias de los ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, clon Dm28c.
- El efecto tripanocida observado corresponde a BSO. Esto es debido a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos BSO y su combinación con nifurtimox en las dosis utilizadas.
- El ácido acetilsalicílico demostró tener, en bajas dosis, actividad tripanocida en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, clon Dm28c. El AAS disminuyó las parasitemias y la inflamación del músculo cardíaco y aumentó la supervivencia.

Proyecciones:

- En cuanto a los resultados obtenidos al utilizar BSO, nos entregan información fundamental para seguir con estudios que se aproximen más a una posible terapia en pacientes que padecen esta enfermedad.
- Con respecto al AAS, lo observado es muy importante, ya que en la actualidad es un medicamento autorizado para su utilización en humanos, por lo que el potencial uso contra la enfermedad de Chagas sería un gran aporte, ya que representaría una posibilidad real y cercana de terapia.

BIBLIOGRAFÍA

- **Abdalla, G. K., Faria, G. E. L., Silva, K. T., Castro, E. C. C., Reis, M. A., Michelin, M. A.** 2008. *Trypanosoma cruzi*: The role of PGE2 in immune response during the acute phase of experimental infection. *Exp. Parasitol.* 118: 514–521.
- **Anderson, M. E.** 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem. Biol. Interact.* 111-112: 1-14.
- **Andrade, L. O., Andrews, N. W.** 2004. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J. Exp. Med.* 200: 1135-1143
- **Ariyanayagam, M. R., Fairlamb, A. H.** 2001. Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115: 189-198.
- **Ariyanayagam, M. R., Oza, S. L., Mehlert, A., Fairlamb, A. H.** 2003. Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 278: 27612-27619.
- **Ashton, A. W., Mukherjee, S., Nagajyothi, F., Huang, H., Braunstein, V. L., Desruisseaux, M. S., Factor, S. M., Lopez, L., Berman, J. W., Wittner, M., Scherer, P. E., Capra, V., Coffman, T. M., Serhan, C. N., Gotlinger, K., Wu, K. K., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B.** 2007. Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* 204: 929–940.
- **Atías, A.** 1998. *Parasitología Médica*. 1ª ed. Santiago. Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda. Pp. 251-264.

- **Bailey, H. H., Mulcahy, R. T., Tutsch, K. D., Arzoomanian, R. Z., Alberti, D., Tor, M. B., Wilding, G., Pomplun, M., 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., Wilding, G.** 1997. Phase I study of continuous-infusion L-S,R-buthionine sulfoximine with intravenous melphalan. *J. Natl. Cancer Inst.* 89: 1789-1796.
- **Burri, C., Brun, R.** 2003. Eflornithine for the treatment of human African trypanosomiasis. *Parasitol. Res.* 1: S49-52.
- **Caler, E. V., Morty, R. E., Burleigh, B. A., Andrews, N. W.** 2000. Dual role of signaling pathways leading to Ca²⁺ and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 68: 6602–6610.
- **Cardoni, R. L., Antúnez, M. I.** 2004. Circulating levels of cyclooxygenase metabolites in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Mediators inflamm.* 13: 235-240.
- **Castro, J. A., Díaz 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.
- **Castro, J. A., de Mecca, M. M., Bartel, L. C.** 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum. Exp. Toxicol.* 25: 471-479.
- **Comini, M. A., Guerrero, S. A., Haile, S., Menge, U., Lünsdorf, H., Flohé, L.** 2004. Validation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase as drug target. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 1289-302.

- **Fabrino, D. L., Leon, L. L., Parreira, G. G., Genestra, M., Almeida, P. E., Melo, R. C.** 2004. Peripheral blood monocytes show morphological pattern of activation and decreased nitric oxide production during acute Chagas' disease in rats. *Nitric Oxide*. 11: 166-174.
- **Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., Henson, P. M.** 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* 101: 890-898.
- **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: 187-198.
- **Fairlamb, A. H., Henderson, G. B., Bacchi, C. J., 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., Cerami, A.** 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 695-729.
- **Faúndez, M., Pino, L., Letelier, P., Ortiz, C., López, R., Seguel, C., Ferreira, J., Pavani, M., Morello, A., Maya, J. D.** 2005. Buthionine sulfoximine increases the toxicity of Nifurtimox and Benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 126-130.
- **Fernández, A. P., Holmgren, A.** 2004. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid. Redox Signal.* 6: 63-74.

- **Filardi, L. S., 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.
- **Flohe, L., Hecht, H. J., Steinert, P.** 1999. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 966-984.
- **Fong, C. Y., Pang, L., Holland, E., Knox, A. J.** 2000. TGF-beta1 stimulates IL-8 release, COX-2 expression, and PGE(2) release in human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: L201-207.
- **Freire de Lima, C. G., Nascimento, D. O., Soares, M. B., Bozza, P. T., Castro Faria Neto, H. C., de Mello, F. G., DosReis, G. A., Lopes, M. F.** 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 403: 199-203.
- **Freire de Lima, C. G., Xiao, Y. Q., Gardai, S. J., Bratton, D. L., Schiemann, W. P., Henson, P. M.** 2006. Apoptotic Cells, through Transforming Growth Factor β , Coordinately Induce Anti-inflammatory and Suppress Pro-inflammatory Eicosanoid and NO Synthesis in Murine Macrophages. *J. Biol. Chem.* 281: 38376–38384.
- **Hernández, S. M., Sánchez, M. S., Schwarcz de Tarlovsky, M. N.** 2006. Polyamines as a defense mechanism against lipoperoxidation in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica.* 98: 94–102.
- **Hideko T., V. L., Cecchini, R., Borges, C. L., Malvezi, A. D., Graça de Souza, V. K., Yamada-Ogatta, S. F., Rizzo, L. V., Pinghe-Filho, P.** 2008. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Inmunol. Med. Microbiol.* 52: 47-58.

- **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: 187-197.
- **Jones, C. M., Lawrence, A., Wardman, P., Burkitt, M. J.** 2003. Kinetics of superoxide scavenging by glutathione: an evaluation of its role in the removal of mitochondrial superoxide. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 1337-1339.
- **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: 404-409.
- **Krauth-Siegel, R. L., Meiering, S. K., Schmidt, H.** 2003. The parasite-specific trypanothione metabolism of *trypanosoma* and *leishmania*. *Biol. Chem.* 384: 539-549.
- **Kim, J. G., Hahn, Y. S.** 2000. IFN-gamma inhibits the suppressive effects of PGE2 on the production of tumor necrosis factor-alpha by mouse macrophages. *Immunol. Invest.* 29: 257-269.
- **Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. L., Flavell, R. A.** 2006. Transforming Growth Factor- β Regulation of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 24: 99–146.
- **Logan, F. J., Taylor, M. C., Wilkinson, S. R., Kaur, H., Kelly, J. M.** 2007. The terminal step in vitamin C biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* is mediated by a FMN-dependent galactonolactone oxidase. *Biochem. J.* 407: 419-426.

- **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: 381-385.
- **Magez, S., Stijlemans, B., Radwanska, M., Pays, E., Ferguson, M. A., Debestlier, P.** 1998. The glycosyl-inositol-phosphate and dimyristoylglycerol moieties of the glycosylphosphatidylinositol anchor of the *Trypanosoma* variant specific surface glycoprotein are distinct macrophage activating factors. J. Immunol. 160: 1949.
- **Maya, J. D., Repetto, Y., Agosin, M., Ojeda, J. M., Tellez, R., Gaule, C., 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.
- **Maya, J. D., Morello, A.** 2005. Inhibition of glutathione synthesis as a potential therapeutic strategy against Chagas` disease. J. of Biol. Sci. 5: 847-854.
- **Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., Morello, A.** 2007. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comp. Biochem. Physiol. Part A 146: 601-620.
- **Mehlotra, R. K.** 1996. Antioxidant defense mechanisms in parasitic protozoa. Crit. Rev. Microbiol. 22: 295-314.
- **Miles, M.** 2003. American tripanosomiasis and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. Brit. Med. J. 326: 1444-1448.

- **Michelin, M. A., Silva, J. S., Cunha, F. Q. C.** 2005. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp. Parasitol.* 111: 71-79.
- **Moncayo, A.** 1993. Research priorities. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 26 Suppl 3: 65-71.
- **O'Dwyer, P. J., Hamilton, T. C., Lacreata, F. P., Gallo, J. M., Kilpatrick, D., Halbherr, T., Brennan, J., Bookman, M. A., Hoffman, J., Young, R. C., Comis, R. L., Ozols, R. F.** 1996. Phase I trial of buthionine sulfoximine in combination with melphalan in patients with cancer. *J. Clin. Oncol.* 14: 249-256.
- **Peluffo, G., Piacenza, L., Irigoín, F., Alvarez, M. N., Radi, R.** 2004. L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Trends Parasitol.* 20: 363-369.
- **Pinge-Filho, P., Tadokoro, C. E., Abrahamsohn, I. A.,** 1999. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell. Immunol.* 193: 90-98.
- **Previsto, J. O., Wait, R., Jones, C., DosReis, G. A., Todeschini, A. R., Heise, N., Previsto, L. M.** 2004. Glycoinositolphospholipid from *Trypanosoma cruzi*: structure, biosynthesis and immunobiology. *Adv. Parasitol.* 56: 1-41.
- **Rodrigues Coura, J., de Castro, S. L.** 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97: 3-24.

- **Ropert, C., Almeida, I. C., Closel, M., Travassos, L. R., Ferguson, M. A., Cohen, P., Gazzinelli, R. T.** 2001. Requirement of mitogen-activated protein kinases and I kappa β phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 166: 3423-3431.
- **Rosestolato, C. T. F., Dutra, J. M. F., De Souza, W., Carvalho, T. M. U.** 2002. Participation of host cell actin filaments during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell. Struct. Funct.* 27: 91–98.
- **Temperton, N. J., Wilkinson, S. R., Meyer, D. J., 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: 167-176.
- **Teixeira, A. R., Nitz, N., Guimaro, M. C., Gomes, C., Santos-Buch, C. A.** 2006. Chagas disease. *Postgrad Med. J.* 82: 788-798.
- **Turrens, J. F.** 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol. Aspects Med.* 25: 211-220.
- **Une, C., Andersson, J., Orn, A.** 2003. Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Exp. Immunol.* 134: 195-201.
- **Urbina, J. A., Concepcion, J. L., Caldera, A., Payares, G., Sanoja, C., Otomo, T., Hiyoshi, H.** 2004. In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2379-2387.

- **Vieira, M., Dutra, J. M., Carvalho, T. M., Cunha-e-Silva, N. L., Souto-Padron, T., Souza, W.** 2002. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem Cell. Biol.* 118: 491-500.
- **Waghbi, M. C., Keramidas, M., Feige, J. J., Araujo-Jorge, T. C., Bailly, S.** 2005. Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbiol.* 7: 511-517.
- **WHO.** 2002. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. Tech. Report Series; 905.
- **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: 8220-8225.
- **Wilkinson, S. R., Prathalingam, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M.** 2005. Vitamin C biosynthesis in trypanosomes: a role for the glycosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102: 11645-11650.
- **Woolsey, A. M., Sunwoo, L., Petersen, C. A., Brachmann, S. M., Cantley, L. C., Burleigh, B. A.** 2003. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J. Cell. Sci.* 116: 3611–3622.