

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA DE MAestrÍA EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

Efecto tripanomicida de nuevos derivados de
1-{(5-R₁tiofen)metilen}-2- (o-;p-R₂)fenil
hidrazona sobre estadios de *Trypanosoma cruzi*
presentes en el huésped vertebrado

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS
P R E S E N T A :
QBP. JUAN CARLOS VILLALOBOS ROCHA

DIRECTORES DE TESIS:
DR. BENJAMÍN NOGUEDA TORRES
DR. EDUARDO CORTÉS CORTÉS



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. EDUARDO CORTÉS CORTÉS DEL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNAM Y DEL DR. BENJAMÍN NOGUEDA TORRES DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA, ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

ÍNDICE

Índice de tablas	i
Índice de figuras	ii
Índice de abreviaturas	iv
Abstract	v
Resumen	vi
1 Introducción	1
1.1 Tripanosomiasis Americana (Mal de Chagas)	1
1.2 Agente etiológico	4
1.3 Fases morfológicas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.4 Ciclo de vida	7
1.5 Mecanismos de transmisión	9
1.6 Fases clínicas de la enfermedad	11
1.7 Diagnóstico	12
1.8 Tratamiento	13
2 Antecedentes	17
3 Justificación	20
4 Objetivos	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos particulares	21
5 Material y métodos	21
5.1 Material	21
5.1.1 Material biológico	21
5.1.2 Compuestos	22
5.2 Métodos de evaluación <i>in vitro</i>	23
5.2.1 Actividad <i>in vitro</i> de 1-{(5-R ₁ -tiofen)metilen}-2-(o;p-R ₂) fenil hidrazona sobre <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
5.2.2 Cuenta de parásitos por el método de Pizzi	24
5.2.3 Determinación del porcentaje de lisis	24
5.2.4 Determinación de la concentración lítica al 50% (CL ₅₀)	25
5.2.5 Observación de los tripomastigotes sanguíneos después de la evaluación <i>in vitro</i> y obtención del porcentaje de parásitos dañados	25

5.3	Evaluación <i>in vivo</i>	25
5.3.1	Inoculación de ratones	25
5.3.2	Actividad <i>in vivo</i> a corto plazo de <i>Trypanosoma cruzi</i> a diferentes compuestos activos	26
5.3.3	Curvas de parasitemia de <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
5.3.4	Actividad <i>in vivo</i> a largo plazo de <i>Trypanosoma cruzi</i> a diferentes compuestos	26
5.3.5	Obtención e inclusión de órganos en parafina	27
5.3.6	Técnica de Hematoxilina-Eosina (HE)	28
5.3.7	Busqueda de nidos de amastigotes	29
5.3.8	Cura parasitológica	29
6	Análisis estadístico.....	30
7	Resultados	30
7.1	Actividad <i>in vitro</i> de 1- $\{(5-R_1\text{-tiofen)metilen}\}$ -2-(o;p-R ₂) fenil hidrazona sobre la cepa ninoa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
7.2	Observación de los tripomastigotes sanguíneos después de la evaluación <i>in vitro</i> y obtención del porcentaje de parásitos dañados de la cepa ninoa	34
7.3	Actividad <i>in vitro</i> de 1- $\{(5-R_1\text{-tiofen)metilen}\}$ -2-(o;p-R ₂) fenil hidrazona sobre el aislado INC-5 de <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
7.4	Observación de los tripomastigotes sanguíneos después de la evaluación <i>in vitro</i> y obtención del porcentaje de parásitos dañados del aislado INC-5.....	38
7.5	Actividad <i>in vivo</i> a corto plazo de <i>Trypanosoma cruzi</i> a diferentes compuestos activos	41
7.6	Curva de parasitemia de la cepa NINOA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
7.7	Actividad <i>in vivo</i> a largo plazo de <i>Trypanosoma cruzi</i> a diferentes compuestos	45
7.8	Obtención e inclusión de órganos en parafina, técnica de hematoxilina-eosina y búsqueda de nidos de amastigotes	47
7.9	Cura parasitológica	49
8	Discusión	50
9	Conclusión	56
10	Bibliografía	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Derivados de 1-[[[5-R1-tiofen)-2-il]-metilen]-2-(o;p-R2) fenil hidrazona	23
Tabla 2. Determinación de CL ₅₀ por el método de Probits para la cepa NINOA.....	33
Tabla 3. Porcentaje de tripomastigotes sanguíneos de la cepa NINOA con alteraciones morfológicas.....	34
Tabla 4. Determinación de CL ₅₀ por el método de Probits para el aislado INC-5.....	38
Tabla 5. Porcentaje de tripomastigotes sanguíneos del aislado INC-5 con alteraciones morfológicas.....	39

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Fase de epimastigote <i>T. cruzi</i>	5
FIGURA 2. Fase de tripomastigote <i>T. cruzi</i>	6
FIGURA 3. Fase de amastigote de <i>T. cruzi</i>	6
FIGURA 4. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
FIGURA 5. Estructura química del nifurtimox	13
FIGURA 6. Estructura química del benznidazol	14
FIGURA 7. 1-{[(5-R1-tiofen)-2-il]-metilen}-2-(o;p-R2) fenil hidrazona..	22
FIGURA 8. Porcentaje de lisis de tripomastigotes sanguíneos de <i>T. cruzi</i> , cepa NINOA	31
Figura 9. Efecto dosis-respuesta sobre la cepa NINOA de los diferentes compuestos con grupo nitro.....	32
Figura 10. Efecto dosis-respuesta sobre la cepa NINOA de los diferentes compuestos sin grupo nitro.....	32
FIGURA 11. Observación de los tripomastigotes sanguíneos (100x) de la cepa NINOA	35
FIGURA 12. Porcentaje de lisis de tripomastigotes sanguíneos de <i>T.</i> <i>cruzi</i> , aislado INC-5.....	35
Figura 13. Efecto dosis-respuesta sobre el aislado INC-5 de los diferentes compuestos con grupo nitro.....	37
Figura 14. Efecto dosis-respuesta sobre el aislado INC-5 de los diferentes compuestos sin grupo nitro.....	37
FIGURA 15. Observación de los tripomastigotes sanguíneos (100x) de <i>T.</i> <i>cruzi</i> aislado INC-5.....	40
FIGURA 16. Disminución de parásitos de la cepa NINOA por el método de Brener (vehículo A).....	42

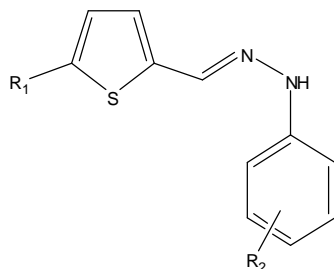
FIGURA 17. Disminución de parásitos de la cepa NINOA por el método de Brener (vehículo B).....	42
FIGURA 18. Disminución de parásitos del aislado INC-5 por el método de Brener (vehículo A)	43
FIGURA 19. Disminución de parásitos del aislado INC-5 por el método de Brener (vehículo B)	43
FIGURA 20. Curva de parasitemia de la cepa NINOA	45
FIGURA 21. Evaluación <i>in vivo</i> del efecto tripanocida de los compuestos IIa-1, IIa-6 y IIa-10 en comparación con el nifurtimox sobre la cepa NINOA.....	46
FIGURA 22. Corte histológico de corazón de ratón libre de infección (control negativo)..	47
FIGURA 23. Corte histológico de corazón de ratón infectado con la cepa NINOA que recibió el tratamiento con el fármaco de referencia nifurtimox.....	<u>48</u>
FIGURA 24. Corte histológico de corazón de ratón infectado con la cepa NINOA que recibió el tratamiento con el compuesto IIa-1	
FIGURA 25. Cortes histológicos de corazón de ratón infectado con la cepa NINOA que recibió el tratamiento con el compuesto IIa-6.....	<u>48</u>
FIGURA 26. Corte histológico de corazón de ratón infectado con la cepa NINOA que recibió el tratamiento con el compuesto IIa-10	<u>48</u>

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BHI	Medio infusión Agar-Cerebro-Corazón
DMSO	Dimetil Sulfoxido
INC-5	Aislado de <i>T. cruzi</i> del Instituto de Cardiología #5
NINOA	Aislado de <i>T. cruzi</i> de un paciente de Oaxaca
SFB	Suero Fetal Bovino
SSF	Solución Salina Fisiológica

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a protozoan parasite that causes Chagas disease. The drugs most frequently used for the treatment are the nitroheterocyclic compounds: nitrofuran (nifurtimox) and nitroimidazole derivative (benznidazole). Treatment options for *T. cruzi* infections are suboptimal due to their toxicity and the presence of resistant strains. Trypanocidal activity *in vitro* and *in vivo* of ten new 1-((5-R₁thiophen)methylene)-2-(o;p-R₂)phenyl hidrazone derivatives against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* was studied.

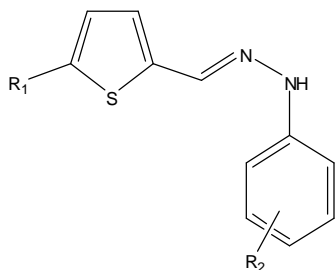


COMPUESTO	R1	R2
Ila-1	H	p-Br
Ila-2		p-Cl
Ila-3		o-NO ₂
Ila-4		o-F
Ila-5		H
Ila-6	NO ₂	p-Br
Ila-7		p-Cl
Ila-8		o-NO ₂
Ila-9		o-F
Ila-10		H

The designed compounds have structural similarities with Nifurtimox that is reference drug. Five compounds (Ila-1, Ila-4, Ila-6, Ila-7 and Ila-10) shown trypanocidal activity *in vitro* against the NINOA strain. Only II-1 shown trypanocidal activity against both strains. Three of the compounds derived from the fenilhidrazona (II-1, II-6 and II-10) exhibited trypanocidal activity *in vivo* in short term experiment. In the long term experiment *in vivo* only two compounds (II-1 and II-6) presented trypanocidal activity with the NINOA strain and the Ila-6 was the best, reducing the parasitemia peak to 55.5%. The compound Ila-1 dropped the parasitemia peak to 63.6%. No compound managed the parasitological cure except nifurtimox.

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es el parásito protozoario que causa la enfermedad de Chagas. Los fármacos más frecuentemente usados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son compuestos nitroheterocíclicos: un nitrofurano (nifurtimox) y un derivado nitroimidazol (benznidazol). El tratamiento para las infecciones por *T. cruzi* no es óptimo debido a su toxicidad y la presencia de cepas resistentes. Se estudió la actividad tripanocida *in vitro* e *in vivo* de diez nuevos derivados de 1-{(5-R₁tiofen)metilen}-2- (o-;p-R₂)fenil hidrazona:



COMPUESTO	R1	R2
Ila-1	H	p-Br
Ila-2		p-Cl
Ila-3		o-NO ₂
Ila-4		o-F
Ila-5		H
Ila-6	NO ₂	p-Br
Ila-7		p-Cl
Ila-8		o-NO ₂
Ila-9		o-F
Ila-10		H

Los compuestos diseñados mantuvieron similitudes estructurales con el fármaco de referencia nifurtimox. Cinco de los compuestos (Ila-1, Ila-4, Ila-6, Ila-7 y Ila-10) presentan actividad tripanocida sobre la cepa NINOA en el modelo *in vitro*, comparable con los fármacos de referencia. Sólo el compuesto Ila-1 presenta actividad en ambas cepas estudiadas. Tres de los compuestos derivados de la fenilhidrazona (Ila-1, Ila-6 y Ila-10) presentan actividad tripanocida en el modelo *in vivo* a corto plazo con la cepa NINOA. En el modelo *in vivo* a largo plazo sólo dos compuestos (Ila-1 y Ila-6) presentaron actividad tripanocida con la cepa NINOA. El compuesto Ila-6 fue el que tuvo mejor actividad tripanocida en el modelo *in vivo* a largo plazo, redujo 45.5% la parasitemia en el pico máximo. El compuesto Ila-1 redujo 36.4% la parasitemia en el pico máximo. Ningún compuesto logró la cura parasitológica excepto el nifurtimox.

1 Introducción

1.1 Tripanosomiasis Americana (Mal de Chagas)

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una zoonosis causada por *Trypanosoma cruzi*, parásito protozoario flagelado que se localiza exclusivamente en el continente Americano y que ha estado presente en este por más de 9000 años (Aufderheide *et al.*, 2004), perteneciente a la familia de los tripanosomátidos, incluidos en el orden Kinetoplastida.

El parásito fue aislado por primera vez por el Dr. Carlos Chagas en el año de 1909 en Brasil, de las heces de insectos triatomíneos, los cuales son los transmisores de la enfermedad en humanos como en animales (Pinto-Dias, 1984). La enfermedad de Chagas es un problema de salud pública y ocupa el quinto lugar dentro de las diez enfermedades parasitarias más importantes del mundo y el segundo lugar sólo después de la malaria en prevalencia y mortalidad en el continente americano por ser transmitida por insectos vectores. Aproximadamente 25 millones de personas se encuentran en riesgo de exposición a la infección, con una estimación total de 9 millones de casos infectados (WHO, 2002).

De acuerdo con reportes de la Organización Mundial de la Salud las tasas de mortalidad varían de 8 a 12% dependiendo del país estudiado, edad, condiciones de salud de los pacientes y tratamiento recibido. Estudios recientes mostraron que hay aproximadamente 200 000 nuevos casos y 21 000 muertes por año asociados con la enfermedad de Chagas (WHO, 2002).

En Estados Unidos la infección se encuentra asociada con más frecuencia a inmigrantes de Centro y Sudamérica, entre 100 mil y 675 mil infectados (WHO Progress 1995-1996).

La enfermedad de Chagas tiene alta prevalencia en zonas rurales tropicales y subtropicales, generalmente en zonas con altitud sobre el nivel del mar por debajo de 1380m donde prosperan las más de 100 especies de insectos vectores; entre los mas importantes se encuentran *Triatoma spp*, *Rhodnius spp* y *Pastrongylus spp*.

Literatura desde 1928 hasta 2004 fue recopilada de diferentes fuentes documentales publicadas en México y consta de 907 publicaciones que incluyen artículos científicos, reportes técnicos y resúmenes de conferencias; esta información fue usada para construir mapas describiendo la distribución de la enfermedad de Chagas de acuerdo a diferentes criterios: la enfermedad, vectores, reservorios y cepas.

Esto puede ayudar a identificar regiones de riesgo de contraer la enfermedad, programas de control del vector y estudiar la asociación reservorio-parásito. Con esta información recolectada se construyó una base de datos: CHAGMEX, disponible en Internet. De acuerdo a Fuentes seroepidemiológicas ingresadas a la base de datos, han sido reportados 16,979 casos humanos de la enfermedad de Chagas en México. (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006.)

Así mismo se calculó con un análisis espacial de las localidades donde se ha encontrado *Trypanosoma cruzi* (infectando a hospederos vertebrados y vectores), que el parásito se podría localizar en 2,025 municipios dentro de la República Mexicana, en los cuales según el censo de población y vivienda (INEGI, 2000) se encuentran un total de 13,786,990 viviendas, donde habitan 61,752,280 personas.

En estos municipios viven 23,022,438 personas que se encuentran en riesgo de infectarse con este parásito; según la OMS el riesgo relativo de adquirir la enfermedad de Chagas es causada directamente por la pobreza, debido entre otros factores al material de construcción utilizado en las casas (refugios naturales, casas móviles, materiales de desecho, láminas de cartón, de asbesto, palma y madera entre otros) (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006.)

El primer reporte relacionado al parásito de la enfermedad de Chagas en México (Hoffman, 1928) fue una descripción de *Triatoma dimidiata*; pero no fue hasta 1940 que se describió el primer caso humano en el país (Mazzotti, 1940). Hasta 1990 se tenían identificados aproximadamente 300 casos agudos y un número similar de pacientes con cardiopatía Chagásica crónica (Tapia-Conyer *et al.*, 1992).

Actualmente se considera que la región amazónica y el sureste mexicano son los principales retos en el control de vectores para la transmisión de la enfermedad de Chagas (Dias *et al.*, 2002). La transmisión de *Trypanosoma cruzi* a humanos puede ocurrir por transfusión vectorial (insectos hematófagos del orden hemíptero y correspondiente a varios géneros de la familia Reduvidae) (Coura y De Castro, 2002), transfusiones con sangre infectada, transmisión congénita y otras causas, como son los accidentes de laboratorio.

1.2 Agente etiológico

Reino: protista
Subreino: protozoa
Phylum: sarcomastigophora
Subphylum: mastigophora
Clase: zoomastigophora
Orden: kinetoplastida
Suborden: trypanosomatina
Familia: trypanosomatidae
Género: Trypanosoma
Subgénero: schizotrypanum
Especie: *T. cruzi*

La familia Trypanosomatidae también incluye al género *Leishmania* spp., el género *Trypanosoma* incluye microorganismos eucariotas unicelulares (protozoos), móviles por un flagelo y parásitos de un amplio rango de seres vivos, desde insectos a mamíferos, incluidos los seres humanos.

Causa enfermedades tales como la tripanosomiasis Africana o enfermedad del sueño en África y la enfermedad o mal de Chagas, en Centro y Sudamérica. *Trypanosoma cruzi* tiene los principales componentes de las células eucariotas: núcleo, microtúbulos (citoesqueleto y flagelo), retículo endoplásmico, aparato de Golgi y tiene una sola mitocondria. Además presenta un organelo llamado cinetoplasto en la base del flagelo (WHO, 2002).

1.3 FASES MORFOLÓGICAS DE *Trypanosoma cruzi*

Epimastigote: es una fase de multiplicación extracelular en el huésped invertebrado (insecto vector), se divide por fisión binaria, son menos móviles que los tripomastigotes, pasan desde el intestino medio hasta el intestino posterior del insecto. Morfológicamente el cinetoplasto está localizado centralmente anterior al núcleo, el flagelo emerge de la mitad del parásito y la membrana ondulante es más corta que en la forma de tripomastigote (Kirchhoff, 2000).



FIGURA 1. Fase de epimastigote *T. cruzi*
www.uta.edu

Tripomastigote metacíclico: es la fase no replicativa e infectiva para el hombre u otros mamíferos y producto de la diferenciación de los epimastigotes en la porción distal del intestino del vector, se deposita en las heces del triatoma para luego penetrar por mucosas del huésped e infectar células. Tiene una forma alargada que mide entre 20 y 25 μm de longitud. Se distingue un núcleo vesiculoso y hacia la parte posterior de éste se encuentra el cinetoplasto de forma esférica. El flagelo con su membrana ondulante se observa a lo largo del cuerpo del parásito y surge libremente en el extremo posterior (De Souza, 2002).

Tripomastigote sanguíneo: es la fase no replicativa e infectiva para el insecto vector y el mamífero; puede infectar a nuevas células o pasar al huésped invertebrado y cerrar así el ciclo de vida del parásito, morfológicamente es muy parecido al tripomastigote metacíclico (De Souza, 2002).



FIGURA 2. Fase de tripomastigote *T. cruzi*
www.uta.edu

Amastigote: es un estadio de multiplicación en el huésped vertebrado, es intracelular, no móvil y se divide por fisión binaria. Los agregados de amastigotes son conocidos como pseudoquistes ó nidos de amastigotes; éstos pueden ser vistos en secciones de tejidos infectados. Morfológicamente el parásito es esférico, no presenta flagelo libre y el cinetoplasto es encontrado cerca del núcleo anterior a éste (Kirchhoff, 2000).



FIGURA 3. Fase de amastigote de *T. cruzi*
www.uta.edu

1.4 Ciclo de vida

El vector de *Trypanosoma cruzi* es un insecto hematófago de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae* y géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Pastrongylus*, conocidos popularmente como chinches besuconas o con otros nombres según los países; en Colombia se les llama "pitos", en Brasil "barbeiros", en Venezuela "chupos", en Argentina y Chile "vinchucas", etc. Estos vectores se infectan al ingerir sangre del hombre o mamíferos con tripomastigotes sanguíneos.

Los tripomastigotes sufren transformaciones a lo largo del tubo digestivo del vector. Estudios experimentales han permitido distinguir su evolución en tres fases: formas redondeadas en el estómago, denominadas por algunos como esferomastigotes; epimastigotes en el intestino medio, que se multiplican intensamente por división binaria y tripomastigotes metacíclicos infectantes para el huésped vertebrado. Por lo general el vector se torna infectante entre 16 y 17 días después de ingerir la fase infectante (tripomastigote sanguíneo) y el parásito parece no causar daño a la chinche (Tyler and Engman, 2001) y permanece así toda su vida que es de un año aproximadamente (Botero and Restrepo, 2003).

Los triatominos infectados al picar nuevamente al hombre o a los animales y después de una ingestión abundante de sangre, defecan fácilmente sobre la superficie. Cuando estas deyecciones se frotan sobre la piel contaminan el sitio de la picadura u otro punto lesionado y los parásitos penetran al tejido.

Las deyecciones infectantes también pueden llegar a la conjuntiva al ser depositadas en la hendidura palpebral o por que el mismo paciente a través de sus manos las lleva hasta el ojo u otras mucosas, a través de las cuales penetran los parásitos sin necesidad de tener excoriaciones.

La infección comienza con la penetración de los tripomastigotes metacíclicos en los macrófagos que se encuentran en los tejidos subcutáneos y la dermis.

Los parásitos sobreviven a la fagocitosis de los macrófagos ya que escapan del fagosoma antes de la fusión con el lisosoma y se dirigen al citoplasma (Lanzer *et al.*, 1997), allí se transforman en amastigotes y se multiplican activamente por división binaria.

Más tarde se diferencian de nuevo en tripomastigotes los cuales, al lizar la célula son liberados a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo, esta forma flagelada promueve la infección de una célula a otra del huésped hasta colonizar músculo o tejido neural donde se enquistan y forman los nidos de amastigotes, repitiéndose indefinidamente el ciclo de infección (Tay *et al.*, 2002), esta etapa coincide con la fase aguda de la enfermedad que dura de 10 a 15 días aproximadamente y se caracteriza por una intensa multiplicación parasitaria en los tejidos y elevada parasitemia.

Durante la fase crónica la parasitemia suele ser mínima y predomina el parasitismo tisular.

La parasitemia es una fase obligatoria para poder asegurar la transmisión, pues el vector toma el parásito de la sangre durante su ingesta. La aparición de los parásitos en la sangre ocurre aproximadamente después de 7 a 14 días de la infección (periodo prepatente).

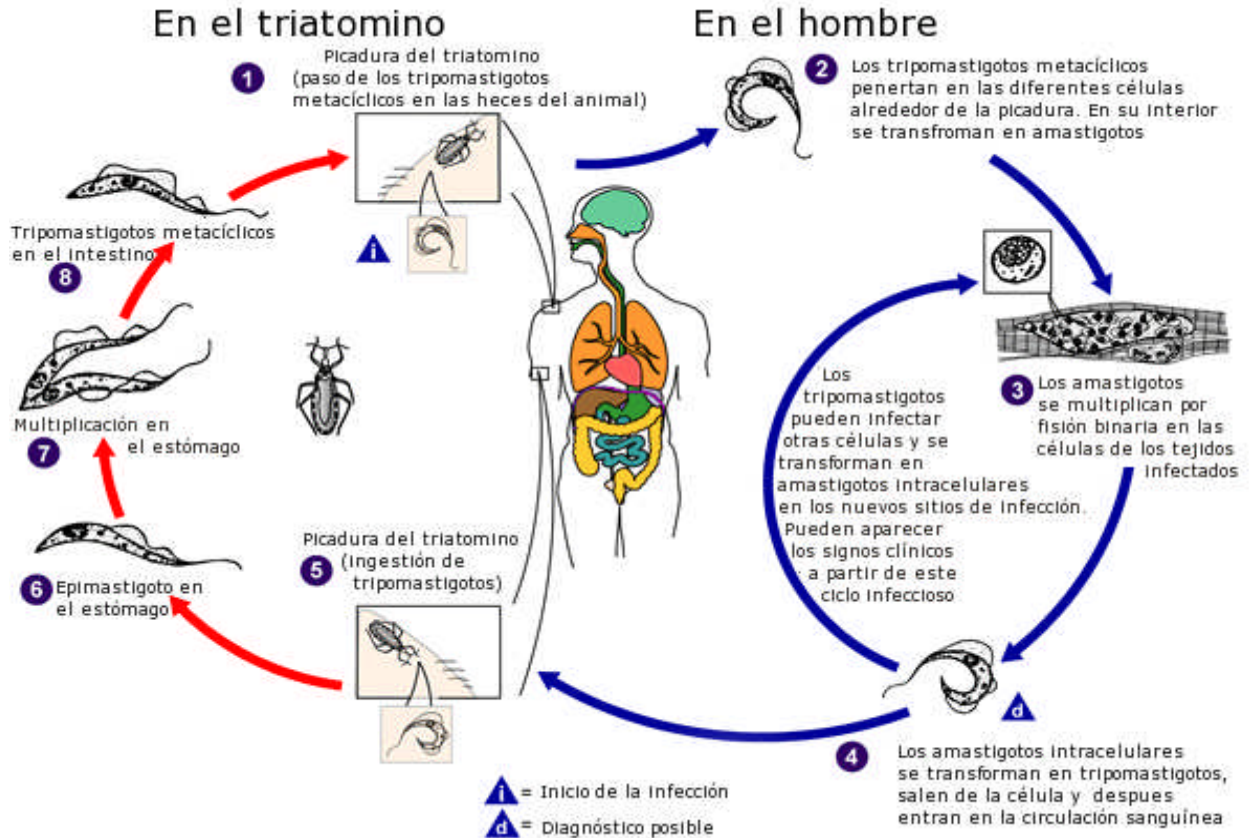


FIGURA 4. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*
www.astrored.org

1.5 Mecanismos de transmisión

La principal vía de transmisión del *T. cruzi* entre sus huéspedes es la transmisión vectorial; también existe la transmisión transfusional y la vía congénita. Las otras vías de transmisión son excepcionales (accidental, transplante de órganos, otros vectores, lactancia materna, etc.).

Transmisión vectorial: las especies mexicanas de mayor importancia médica son: *Rodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma barberi*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma phyllosoma* y *Triatoma picturata* (Vidal et al., 2000).

Transmisión transfusional: es mas frecuente en países donde no se tiene un control adecuado de los donadores de sangre. En cuanto no se descarte la sangre de donadores contaminados, existirá la probabilidad de transmitir la enfermedad por esta vía (Reyes *et al.*, 1999).

Transmisión congénita: constituye la tercera vía más importante de transmisión. Ocurre durante la segunda mitad de la gestación los tripomastigotes sanguíneos en la sangre de la madre pueden atravesar la barrera placentaria e infectar al producto.

Transplante de órganos: los transplantes de órganos de donantes procedentes de zonas endémicas pueden llevar los parásitos y llegar a un huésped inmunosuprimido diseminando la parasitosis (Moraes-Souza and Bordin, 1996).

Lactancia materna: se han registrado pocos casos, en uno de los casos se encontraron tripomastigotes en la leche de la madre.

Manipulación de animales infectados: sucede entre cazadores que desollan animales y manipulan sus carnes infectadas.

Infecciones en el laboratorio: en accidentes que ocurren al manipular sangre infectada de animales utilizados para mantener las cepas de *T. cruzi* y cultivos. (Tay *et al.*, 2002).

1.6 Fases clínicas de la enfermedad

La tripanosomiasis americana es una enfermedad crónica, pero la mayoría de las infecciones por *Trypanosoma cruzi* cursan en forma asintomática y algunas se manifiestan mucho tiempo después de la infección inicial. Clínicamente se reconocen tres etapas de la enfermedad; la inicial o aguda que es de corta duración y está separada por una etapa asintomática o indeterminada, para luego entrar poco a poco en la etapa crónica que es muy prolongada.

Fase aguda: esta fase de la enfermedad pasa desapercibida la mayoría de las veces. Se detecta poco en cualquier edad, niños o adultos. Se diagnostica principalmente en los niños menores de 10 años. Los síntomas pueden ser leves y poco característicos, por este motivo solo se logra detectar en un porcentaje no mayor del 10%. La lesión primaria o chagoma de inoculación, se desarrolla en la puerta de entrada del parásito, allí aparece un nódulo inflamatorio blando con piel seca y la zona central se vuelve necrótica o hemorrágica, indolora, con edema local y acompañada de infarto ganglionar de la región. Más tarde la lesión se cubre con una costra dura. En muchos pacientes se observa el complejo oftalmoganglionar conocido como signo de Romaña, que consiste en un edema bipalpebral uni o bilateral, acompañado en algunos casos de edema facial. A menudo se presenta fiebre, linfadenitis, hepatomegalia y esplenomegalia, también se puede presentar daño al sistema nervioso. La mortalidad durante esta fase es del 10 al 15% en ciertas regiones y parece depender hasta cierto punto de la cepa particular del parásito. En la mayoría de los enfermos desaparecen los síntomas, seguido por una aparente recuperación general.

Fase indeterminada: puede haber baja parasitemia, el paciente no presenta sintomatología. Este periodo se inicia de 8 a 10 semanas después de la fase aguda y puede durar meses o años antes de manifestarse la forma crónica. Los pacientes dan pruebas serológicas positivas, por lo que el diagnóstico en esta fase es casual. Se encuentran focos de miocarditis y la disminución de neuronas del plexo parasimpático.

Fase crónica: aparece después de muchos años de la infección inicial. Las lesiones durante esta etapa son irreversibles afectando los órganos internos como el corazón, esófago y el colon y además el sistema nervioso periférico. Después de varios años del periodo asintomático, el 27% de los pacientes infectados tienden a presentar síntomas cardiacos, los cuales pueden ocasionar la muerte; el 6% desarrolla daños digestivos, estos son las megas vísceras (megacolon y/o megaesófago) y un 3% puede tener comprometidos los nervios periféricos (Coura and De Castro, 2002).

1.7 Diagnóstico

El diagnóstico depende de la fase de la enfermedad en que se encuentre el paciente. En la fase aguda el diagnóstico se basa en la observación directa del parásito en sangre. Las técnicas más empleadas son el frotis sanguíneo grueso o el examen de una muestra de sangre fresca colocada entre el portaobjetos y la laminilla.

Durante la fase indeterminada y crónica de la enfermedad la cantidad de parásitos es muy baja e incluso ausente, por lo tanto se hace necesario el aislamiento del parásito. El método más eficiente para aislar *Trypanosoma cruzi* es el Xenodiagnóstico en el cual los triatominos de laboratorio se alimentan de la sangre del paciente y sus heces son examinadas en búsqueda de parásitos 4 semanas después aproximadamente. Sin embargo, por su complejidad y costo es utilizado como último recurso.

En años recientes la técnica de PCR donde se amplifica el ADN del parásito, ha demostrado tener mayor sensibilidad que el Xenodiagnóstico (López-Antuñano; Cevallos y Hernández, 1997).

Cuando se sospecha enfermedad de Chagas y el examen sanguíneo es negativo y no se cuentan con las facilidades para aislar al parásito o para realizar las técnicas de PCR, el diagnóstico puede establecerse demostrando la aparición de anticuerpos específicos por medio de pruebas serológicas como: Hemaglutinación indirecta (HAI), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y las pruebas enzimáticas de ELISA (Toledo *et al.*, 1999; López-Antuñano, 1997).

1.8 Tratamiento

Solamente dos fármacos tripanocidas han sido aceptados, registrados y comercializados por autoridades nacionales de salud en países de América Latina: nifurtimox (Lampit) Fig. 5 y el benznidazol (Radanil) Fig. 6 disponibles desde 1975.

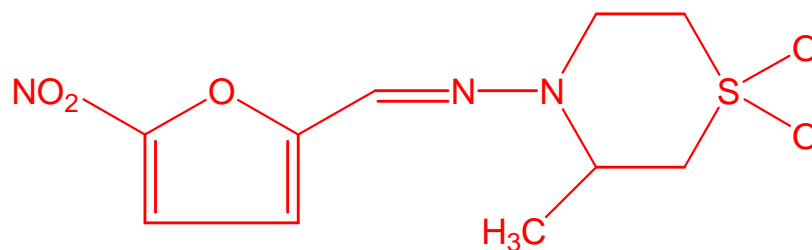


FIGURA 5. Estructura química del nifurtimox

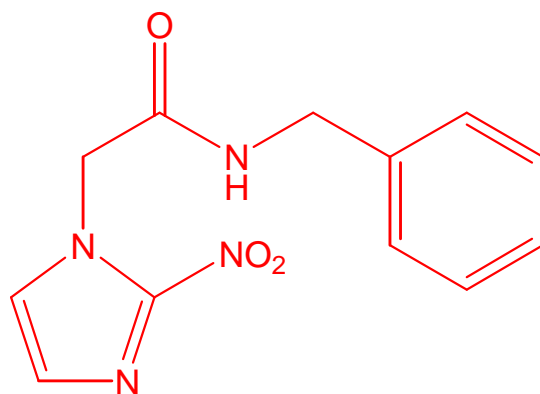


FIGURA 6. Estructura química del benznidazol

En la actualidad la falta de cifras reales, la búsqueda activa de los individuos infectados y de tratamiento de los mismos ha ocasionado que se reduzca la demanda de ambos medicamentos, lo que ha tenido un efecto negativo en su producción por parte de los dos únicos productores Bayer y Roche (Cañas, 2006).

En el año 2003, ya caducada la patente del benznidazol, Roche anunció que iniciaría el proceso de transferencia de tecnología del benznidazol al laboratorio LAFEPE en Brasil. En el año 2004 la OMS se fijó la meta de eliminar la enfermedad de Chagas como problema de salud pública antes del año 2010. En los primeros días de enero de 2006, se anunció que LAFEPE no podría producir ni distribuir el medicamento hasta unos meses más tarde porque no había solventado aún todos los problemas relacionados con la producción, una vez resueltos éste laboratorio será la única planta productora del medicamento que demandan 21 países de Latinoamérica (Cañas, 2006).

Bayer Health Care firmó un acuerdo con la OMS por el que se comprometía a dar 250,000 comprimidos de nifurtimox para combatir la enfermedad de Chagas.

En noviembre de 2005 Bayer anunció una nueva donación y la empresa señaló que estaba dispuesta a facilitar el medicamento a un precio especial a la OMS para garantizar el suministro futuro y a largo plazo (Cañas, 2006).

El nifurtimox (Fig. 5) es identificado químicamente como 3-metil-N-[(5-nitro-2-furanil)metilen]-4-tiomorfolin-4-amina-1,1-dióxido y su mecanismo de acción se debe a la generación de productos de reducción parcial del oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo ($\bullet OH$) y el anión superóxido ($O_2\bullet$) a distintos niveles de la célula; como por ejemplo, en fracciones mitocondriales y microsomales del parásito (D'ocampo, 1980). Los productos de reducción parcial del oxígeno son tóxicos tanto para el parásito como para el humano.

Entre los efectos colaterales a la administración del nifurtimox la mayoría de los pacientes presenta: anorexia, intolerancia digestiva, irritabilidad nerviosa, insomnio y pérdida de peso (Moya *et al.*, 1985). Con menos frecuencia puede presentarse crisis convulsiva, este fármaco es mejor tolerado por niños de corta edad que por personas adolescentes y adultas (Lugones *et al.*, 1969).

Dosificación:

<11 años: 15-20 mg/kg/día c/6h V.O. por 90 días

11-16 años: 12.5-15 mg/kg/día c/6h V.O. por 90 días

>16 años: 8-10 mg/kg/día c/6h V.O. por 120 días

(Organización Panamericana de la Salud, 2002).

El nombre químico del benznidazol (Fig. 6) es N-(benzil-2-nitroimidazol-1-il)acetamida. Su mecanismo de acción tal parece que no se debe a la reducción parcial del oxígeno, sino que probablemente los metabolitos reducidos del benznidazol estén actuando por unión covalente con las macromoléculas del parásito (Maya *et al.*, 2003). De esta forma puede inhibir la síntesis de proteína y de ARN del parásito (Polack and Richle, 1978; Raaflaub and Zigler, 1976).

Entre los efectos colaterales a la administración de éste fármaco se presentan: anorexia, artralgias, cefalea y neuropatías (Souza *et al.*, 1991; Lugones *et al.*, 1969; Castro and Diaz de Toranzo, 1988; Marreto and Andrade, 1994).

Dosificación:

<40 kg: 10 mg/kg c/12h por 30-60 días

>40 kg: 7 mg/kg c/12h por 30-60 días

(Organización Panamericana de la Salud, 2002).

Los efectos colaterales más graves de ambos fármacos son debido a que provocan mutagenicidad cuando se usan en terapia de tiempo prolongado; esto limita la dosis y duración del tratamiento. Estos dos fármacos son solamente efectivos contra la forma circulante del parásito (tripomastigote sanguíneo) durante la fase aguda de la enfermedad, pero no se ha demostrado efecto durante la fase crónica.

2 Antecedentes

Los primeros compuestos ensayados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas fueron: Atoxil (arsenical), fucsina (colorante de rosanilina), tártaro emético (o tártaro antimomial potásico, un antimomial pentavalente) y el cloruro mercúrico, empleados experimentalmente por Rocha Lima en 1914 (Rodríguez-Morales, 2005); los cuales no mostraron actividad. Hasta la publicación del "*Manual de Doenças Tropicaes e Infectuosas*" por Carlos Chagas y Evandro Chagas (1935) no existía un tratamiento específico para la tripanosomiasis Americana. Un gran número de compuestos con actividad tripanocida *in vitro* han sido ensayados pero sin éxito *in vivo*, entre otros: derivados de la quinoleina, arsenobenzoles, arsenicales, fenantridinas, sales de oro, bismuto, cobre, yoduro de sodio, violeta de genciana, aminopterina, ácido para-amino salicílico, ácido nicotínico, antihistamínicos, sulfonamidas, ACTH, cortisona, anfotericina B, más de 30 antibióticos y algunos nitrofuranos.

Entre los años de 1912 y 1962 Brener realizó una evaluación amplia de los compuestos con posible actividad tripanomicida, ensayó *in vitro* e *in vivo* 27 compuestos y más de 30 antibióticos, todos ellos resultaron inactivos. También determinó que los siguientes compuestos tenían un efecto supresor en la parasitemia, pero no tenían efecto curativo: Bisquinaldina Bayer 7602, Sulfato de carbidium de fenatridina (74C48), aminoquinolinas (pentaquina, isopentaquina y primaquina), arsenicales trivalentes (Bayer 9736 y Bayer 10557, también nombrados espirotripanos), aminoglicósidos de estilomicina, nitrofuranos y antibióticos.

En los últimos años se han efectuado diversos estudios probando una gran cantidad de compuestos evaluando su probable actividad tripanocida en experimentos de laboratorio en modelos *in vitro* como *in vivo*; en búsqueda de una quimioterapia eficaz se han probado nuevos fármacos y otros que ya se conocen por tener actividad tripanocida como:

- I. Inhibidores de la biosíntesis de esteroides (IBE): en este grupo se incluyen drogas antifúngicas o Azoles que tienen actividad tripanocida por inhibir la síntesis de Ergosterol, el cual forma parte de la membrana celular del parásito (Urbina, 1997); Miconazol y Econazol fueron los primeros inhibidores que mostraron un potente efecto inhibitor del crecimiento en *T. cruzi* (D'ocampo, 1981).
- II. Inhibidores de las cisteín-proteasas (ICP): el parásito contiene una catepsina cisteínproteasa tipo L llamada cruzipaína responsable de la actividad proteolítica cumpliendo un papel esencial en la supervivencia y crecimiento de *T. cruzi*. Se ha observado que los inhibidores de la cruzipaína pueden inducir cura parasitológica en modelos murinos de enfermedad aguda y crónica, con toxicidad mínima. En este grupo de drogas se encuentran las thio-alquil-semicarbazonas cíclicas, las cuales también inhiben la cruzipaína (Du *et al.*, 2002).
- III. Inhibidores del metabolismo de pirofosfato (IMPP): los Tripanosomátidos tienen organelos especializados: acidocalcisomas, involucrados en el almacenamiento de pirofosfato y cationes así como en la adaptación del microorganismo al estrés ambiental. El ingreso y salida de calcio de la matriz acidocalcisomal es regulado por diversos mecanismos: Ca^{2+} ATPasa, intercambiador Na^+/H^+ , bomba H^+ ATPasa, pirofosfatasas. Las pirofosfatasas son entonces, otro blanco terapéutico de gran potencialidad por existir drogas con actividad contra estas

sustancias generando así los bifosfonatos que se acumulan selectivamente en el parásito y pueden inhibir enzimas involucradas en las reacciones del pirofosfato orgánico e inorgánico, como el farnesil-pirofosfato sintetasa y la escualeno sintetasa (Montalvetti A. *et al.*, 2001).

- IV. Inhibidores de purinas (IP): los Tripanosomátidos son totalmente deficientes en la biosíntesis *de novo* de purinas. Para poder obtener las purinas hacen uso de intermediarios metabólicos. Se ha observado que en estos parásitos el alopurinol actúa como un análogo de purina, siendo incorporado en el ADN del parásito, enseguida ocurre la disrupción de la síntesis de ARN y proteínas. Se ha demostrado la actividad tripanocida *in vivo* (en modelos murinos) del alopurinol (Stoppani, 1999).

1 Justificación

En la actualidad el tratamiento de la enfermedad de Chagas resulta insatisfactorio por no haber registro de pacientes en fase crónica e indeterminada de la enfermedad de Chagas que hayan alcanzado la cura parasitológica, aunado al poco interés que muestra la industria farmacéutica en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de las enfermedades parasitarias que afectan los estratos más bajos de la sociedad.

Por lo anterior es necesario el diseño, desarrollo y evaluación de nuevos fármacos con efecto tripanocida sobre los estadios del parásito presentes en el huésped vertebrado.

Hipótesis:

Si los compuestos de referencia presentan actividad tripanocida atribuida a su estructura nitroheterocíclica con un grupo nitro (NO_2), entonces nuestros derivados de 1- $\{(5\text{-R}_1\text{-tiofen)metilen}\}$ -2-(o;p-R₂) fenil hidrazona los cuales fueron diseñados con similitudes estructurales a los primeros también presentarán actividad tripanocida.

2 Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad tripanocida *in vitro* e *in vivo* de 10 derivados de 1-{(5-R₁-tiofen)metilen}-2-(o;p-R₂) fenil hidrazona.

4.2 Objetivos particulares

- Mantener viable las cepa INC-5 y NINOA por pase triatoma – ratón.
- Comparar la probable actividad tripanocida *in vitro* de los 10 nuevos compuestos con los fármacos de referencia nifurtimox y benznidazol sobre los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*.
- Evaluar de forma comparativa con el fármaco de referencia nifurtimox la actividad tripanocida *in vivo* de los compuestos que mostraron actividad *in vitro*.

3 Materiales y métodos

5.1 Materiales

5.1.1 Material biológico

- Se utilizaron ratones de la cepa CD1 del bioterio de la ENCB-IPN.
- Se utilizó un aislado (INC-5) de *Trypanosoma cruzi* donado por el Dr. Victor Monteón Padilla de la Universidad Autónoma de Campeche y la cepa NINOA donada por el departamento de parasitología de la ENCB-IPN.

Cepa	Sexo del paciente	Edad	Procedencia	Año del aislado
INC-5	Femenino	58 años	Congragación, Gto.	1997
NINOA	Femenino	9 años	Oaxaca	1986

Estas cepas se mantuvieron de tres formas:

- En medio de cultivo bifásico (base agar sangre con 10% de sangre de carnero y fase líquida BHI) y en BHI modificado (adicionado con solución de Lock, Hemina y SFB) con la finalidad de mantener las cepas en fase de epimastigotes.
- En triatomas que se alimentaron de la sangre de ratones CD1, con la finalidad de obtener e infectar a estos con tripomastigotes metacíclicos.
- En ratones CD1 haciendo pases para mantener el parásito en la fase de tripomastigote sanguíneo.

5.1.2 Compuestos

- Cristal Violeta como control positivo (Merck No. de lote 050405)
- Nifurtimox (LAMPIT, BAYER) y Benznidazol (ROCHAGAN, ROCHE) como los fármacos de referencia.
- Estructura de los derivados 1-{(5-R₁-tiofen)metilen}-2-(o;p-R₂) fenil hidrazona (Fig. 7)

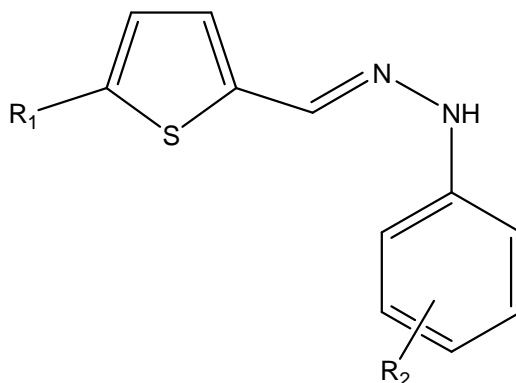


FIGURA 7. 1-{(5-R₁-tiofen)metilen}-2-(o;p-R₂) fenil hidrazona

- Derivados de 1-{(5-R₁-tiofen)metilen}-2-(o;p-R₂) fenil hidrazona que fueron sintetizados por el grupo de trabajo del Dr. Eduardo Cortés del Instituto de Quimica (UNAM) y se diseñaron con base en la estructura del nifurtimox, éstos se presentan en la Tabla 1

Tabla 1 Derivados de 1-[[5-(R1-tiofen)-2-il]-metilen]-2-(o;p-R2) fenil hidrazona

COMPUESTO	R ₁	R ₂	PESO MOLECULAR
Ia-1	H	p-Br	280
Ia-2		p-Cl	236
Ia-3		o-NO ₂	247
Ia-4		o-F	220
Ia-5		H	202
Ia-6	NO ₂	p-Br	323
Ia-7		p-Cl	279
Ia-8		o-NO ₂	290
Ia-9		o-F	265
Ia-10		H	247

5.2 Métodos de evaluación *in vitro*

5.2.1 Actividad *in vitro* de 1-[[5-(R₁-tiofen)metilen]-2-(o;p-R₂) fenil hidrazona sobre *Trypanosoma cruzi*

Se obtuvo sangre por punción cardiaca de ratones infectados con la cepa NINOA y el aislado INC-5 con parasitemias altas (más de 4×10^6 parásitos/mL), utilizando heparina como anticoagulante y solución salina fisiológica (NaCl 0.85%) estéril para diluir la sangre a una concentración final de 1×10^6 tripomastigotes sanguíneos/mL.

Los compuestos fueron disueltos en DMSO, la concentración final del solvente nunca excedió de 2.5%, una concentración no tóxica para parásitos ni células de mamíferos (Reather *et al*, 1988).

Para evaluar la actividad tripanocida de los compuestos se utilizó la sangre infectada con tripomastigotes a una concentración de 1×10^6 parásitos/mL, donde 195 μ L fueron incubados con 5 μ L de los fármacos (para una concentración final de 250, 125, 62.5 y 31.25 μ g/mL del compuesto). La incubación fue realizada en microplacas de 96 pozos a 4 °C por 24 horas (Petray *et al.*, 2004; Menna-Barreto *et al.*, 2008).

Después de las 24 horas de incubación la reducción en el número de tripomastigotes (lisis parasitaria) se determinó usando el método de Pizzi. Se determinó la concentración que causa el 100% de lisis de parásitos (CL_{100}) para la cepa NINOA con cristal violeta, con lo que se determinó que el control positivo fuera de 12.5 μ g/mL de cristal violeta (causó el 100% de lisis) y el control de reactivos DMSO al 2.5% como concentración final en cada pozo, ambos controles fueron usados en todos los experimentos que se hicieron por triplicado para cada cepa y fármaco.

5.2.2 Cuenta de parásitos por el método de Pizzi

Se colectaron 5 μ L de sangre de los ratones infectados haciendo un pequeño corte de la vena caudal, la sangre se depositó en un portaobjetos y se distribuyó uniformemente en el área del cubreobjetos. Se contaron 25 campos microscópicos utilizando el objetivo de 40x, para el conteo se tomó en cuenta el número de campos posibles que se pudieran contar en esta área (Pizzi, 1957; Brener *et al.*, 1984).

5.2.3 Determinación del porcentaje de lisis

Tomando en cuenta la cantidad de tripomastigotes sanguíneos presentes en el control negativo (sangre infectada sin fármaco) se determinó el porcentaje de lisis en función de la cantidad de parásitos que sobrevivieron en presencia del fármaco.

5.2.4 Determinación de la concentración lítica al 50% (CL₅₀)

La actividad tripanocida se expresó como CL₅₀, correspondiente a la concentración causante de la lisis del 50% de los parásitos en comparación al control negativo (195 µL de sangre y 5 µL de Solución Salina Fisiológica). El valor de CL₅₀ se estimó graficando el porcentaje de lisis contra el logaritmo de la concentración del compuesto.

5.2.5 Observación de los tripomastigotes sanguíneos después de la evaluación *in vitro* y obtención del porcentaje de parásitos dañados

Después de la evaluación *in vitro* se realizaron extendidos de la sangre tratada (3 por cada tratamiento para la concentración de mejor actividad), estas extensiones se tiñeron con Giemsa (1:10) durante 30 minutos y posteriormente se observaron al microscopio a 100x para observar si hubo alteraciones morfológicas en los parásitos. Se contaron los tripomastigotes sanguíneos que presentaron algún daño citológico y se determinó el porcentaje de parásitos dañados.

5.3 Evaluación *in vivo*

5.3.1 Inoculación de ratones

Se infectó un lote de 10 ratones CD1 por vía intraperitoneal con un inóculo de 1×10^3 tripomastigotes metacíclicos obtenidos de heces de triatominos infectados con *T. cruzi* (cepa NINOA). Se revisó diariamente la sangre de los ratones parasitados por el método de Pizzi 1957, se obtuvo la sangre infectada y se ajustó a 1×10^4 tripomastigotes sanguíneos/mL y se infectó otro lote de 10 ratones.

5.3.2 Actividad *in vivo* a corto plazo de *Trypanosoma cruzi* a diferentes compuestos activos

Durante la infección de *Trypanosoma cruzi* se alcanzó un máximo de parasitemia (día 24 p.i. aproximadamente) y se administró al ratón una dosis vía oral de 500 mg/kg de peso corporal de los compuestos de prueba (lote de 3 ratones por compuesto) para detectar actividad contra la forma sanguínea circulante a las 0, 2, 4, 6 y 8 horas después de la administración (Filardi and Brener, 1983).

El experimento se realizó para la cepa NINOA y el aislado INC-5; y como control negativo a un lote solo se le administro el vehículo. La cantidad de parásitos se determinó por el método de Pizzi (1957).

5.3.3 Curvas de parasitemia de *Trypanosoma cruzi*

Para cada aislado de *T. cruzi* se inocularon 5 ratones vía intraperitoneal con 1.5×10^5 tripomastigotes sanguíneos provenientes del lote infectado según se describió antes en 5.3.1, se les revisó la parasitemia diario durante los primeros 13 días y después cada tercer día hasta la desaparición de la parasitemia.

5.3.4 Actividad *in vivo* a largo plazo de *Trypanosoma cruzi* a diferentes compuestos

Se inocularon 25 ratones vía intraperitoneal con 1.5×10^5 tripomastigotes sanguíneos de la cepa NINOA. Se les administró una dosis diaria de 100mg/Kg (Boiani *et al*, 2007) durante 15 días vía oral a partir del periodo patente (aparición de tripomastigotes sanguíneos en circulación) utilizando goma arábica al 5% (vehículo A) (Filardi and Brener, 1983). Se utilizaron 5 ratones por cada compuesto y al lote testigo solo se le suministró el vehículo.

La parasitemia se determinó por el método de Pizzi cada tercer día después del periodo prepatente; una vez concluido el tratamiento se sacrificaron los animales para la obtención e inclusión de órganos en parafina.

5.3.5 Obtención e inclusión de órganos en parafina

Una vez concluido el tratamiento se procedió a sacrificar 3 ratones y realizar la disección de los mismos. Se obtuvieron el corazón, hígado, bazo y músculo estriado somático de las piernas. Dichos órganos se sometieron a todos los procesos de la técnica histológica (fijación, lavado, deshidratación, transparentación, inclusión en parafina, obtención de cortes, desparafinación y tinción), hasta la obtención de laminillas histológicas para realizar la búsqueda de nidos de amastigotes.

Fijación: se realizó con formol al 10% con un mínimo de 72 horas, para fijar los componentes celulares, deteniendo sus funciones metabólicas y estabilizando indefinidamente su estructura.

Deshidratación: se realizó para eliminar el agua presente en el órgano, la cual interfiere en el proceso de transparentar e incluir en parafina.

Se llevó a cabo utilizando alcohol etílico en concentraciones crecientes:

1. Alcohol etílico al 30%, dos cambios de 30 minutos cada uno.
2. Alcohol etílico al 50%, dos cambios de 30 minutos cada uno.
3. Alcohol etílico al 60%, dos cambios de 30 minutos cada uno.
4. Alcohol etílico al 70%, dos cambios de 30 minutos cada uno.
5. Alcohol etílico al 80%, dos cambios de 30 minutos cada uno.
6. Alcohol etílico al 96%, tres cambios de 30 minutos cada uno.
7. Alcohol etílico absoluto, tres cambios de 30 minutos cada uno.
8. Alcohol etílico absoluto-Tolueno, por 15 minutos.
9. Tolueno, el tiempo necesario para la transparentación de los órganos, cuya finalidad es sustituir el alcohol y preparar el órgano para recibir la parafina.

Inclusión preliminar en parafina: se procesaron los órganos de la siguiente manera:

Parafina I (punto de fusión 58-60 °C), en la estufa durante 24 horas.

Parafina II (punto de fusión 58-60 °C), en la estufa durante 12 horas.

Parafina III (punto de fusión 58-60 °C), en la estufa durante 12 horas.

Inclusión definitiva en parafina: se utilizó parafina marca Merck con punto de fusión de 56-58 °C para formar los bloques de parafina con los órganos en su interior, para lo cual se emplearon un molde metálico y una base de plástico.

Obtención de cortes: con el microtomo se realizaron cortes de 6 a 8 μm , posteriormente se montaron en portaobjetos.

Desparafinación de los cortes:

Tres cambios en Xilol durante 15 minutos.

Un cambio en alcohol etílico absoluto-Xilol durante 15 minutos.

Hidratar en alcohol etílico al 70% durante 15 minutos.

Un cambio en agua de la llave durante 15 minutos (Estrada et al 1982).

5.3.6 Técnica de Hematoxilina-Eosina (HE)

1. Teñir con Hematoxilina de Harris, durante 15 minutos.
2. Lavar con agua de la llave durante 1 minuto.
3. Diferenciar en alcohol ácido, durante 15 segundos.
4. Lavar con agua de la llave, durante 1 minuto.
5. Virar el pH con agua amoniacal, durante 15 segundos.
6. Lavar con agua de la llave, 3 cambios de 1 minuto cada uno.
7. Teñir con Eosina durante 1 minuto.

8. Deshidratar en alcohol etílico al 96% (10 segundos), alcohol etílico absoluto-Xilol (10 minutos) y en Xilol (tres cambios de 2 horas cada uno).
9. Montar con resina en Xilol (Estrada et al., 1982).

5.3.7 Búsqueda de nidos de amastigotes

Una vez obtenidas las laminillas del órgano (corazón, por ser el tropismo de la cepa estudiada) se procedió a revisarlas a 10x y 40x con la finalidad de encontrar nidos de amastigotes para saber si se obtuvo la eliminación de éstos y en el caso de no encontrar corroborar si realmente se logró la cura parasitológica mediante la siembra de extracto del órgano en medios de cultivo.

5.3.8 Cura parasitológica

Una vez que se sacrificaron 3 de los 5 ratones que se utilizaron en el tratamiento a largo plazo y de los cuales se obtuvieron las laminillas para observar las lesiones producidas por los nidos de amastigotes en el miocardio, los 2 animales restantes fueron procesados para extracción de órganos y maceramiento de los mismos para inocular medios de cultivo BHI los cuales fueron incubados a 27 °C esperando que si en los macerados se encontraban nidos de amastigotes a partir del día 6 de incubación se pueden detectar formas epimastigotes como ya se ha observado en estudios previos (Zaidenberg *et al.*, 2000).

6 Análisis estadístico

Análisis estadístico de los porcentajes de lisis obtenidos en el modelo *in vitro*.

Se utilizó el programa estadístico Sigma Stat 3.5 para realizar el análisis de ANOVA, la prueba de Friedman es una prueba estadística no paramétrica. Similar a las mediciones repetidas paramétricas de ANOVA, es usada para detectar diferencias en tratamientos de prueba a través de múltiples intentos (ver apéndice al final)

7 Resultados

7.1 Actividad *in vitro* de 1- $\{(5-R_1\text{-tiofen})\text{metilen}\}$ -2-(o;p-R₂) fenil hidrazona sobre la cepa NINOA de *Trypanosoma cruzi*

La prueba *in vitro* realizada en este estudio sigue la técnica de evaluación realizada por otros autores (Oliveira *et al* 2003, Pepe *et al* 2004, Petray *et al* 2004 y Menna-Barreto *et al* 2008). Para evaluar la actividad tripanocida la sangre infectada fue incubada en presencia o ausencia de los compuestos de prueba. Se montó nuestra placa con los compuestos disueltos en DMSO a una concentración final de 2.5%, la cual otros estudios no causan daño en la infectividad del parásito, motilidad y no causa daños estructurales (Reather *et al.* 1988). Y como control positivo se utilizó el cristal violeta ya que éste compuesto tiene la capacidad de lisar a los tripomastigotes sanguíneos, ya que es usado en bancos de sangre para el control epidemiológico de la enfermedad. Se incubó a 4 °C (esto para detener el metabolismo del tripomastigote y así evitar su diferenciación a epimastigote) por 24 horas; después de este tiempo la reducción en el número de parásitos (lisis parasitaria) fue determinada usando el método de PIZZI y así se evaluó la actividad *in vitro* de nuestros compuestos y los fármacos de referencia (nifurtimox y benznidazol) sobre la cepa NINOA de *Trypanosoma cruzi*, mostrando todos una actividad tripanocida.

El porcentaje de lisis de los tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* por efecto de los derivados de 1-{(5-R₁-tiofen)metilen}-2-(o;p-R₂) fenil hidrazona sobre la cepa NINOA se muestra en la Fig. 8.

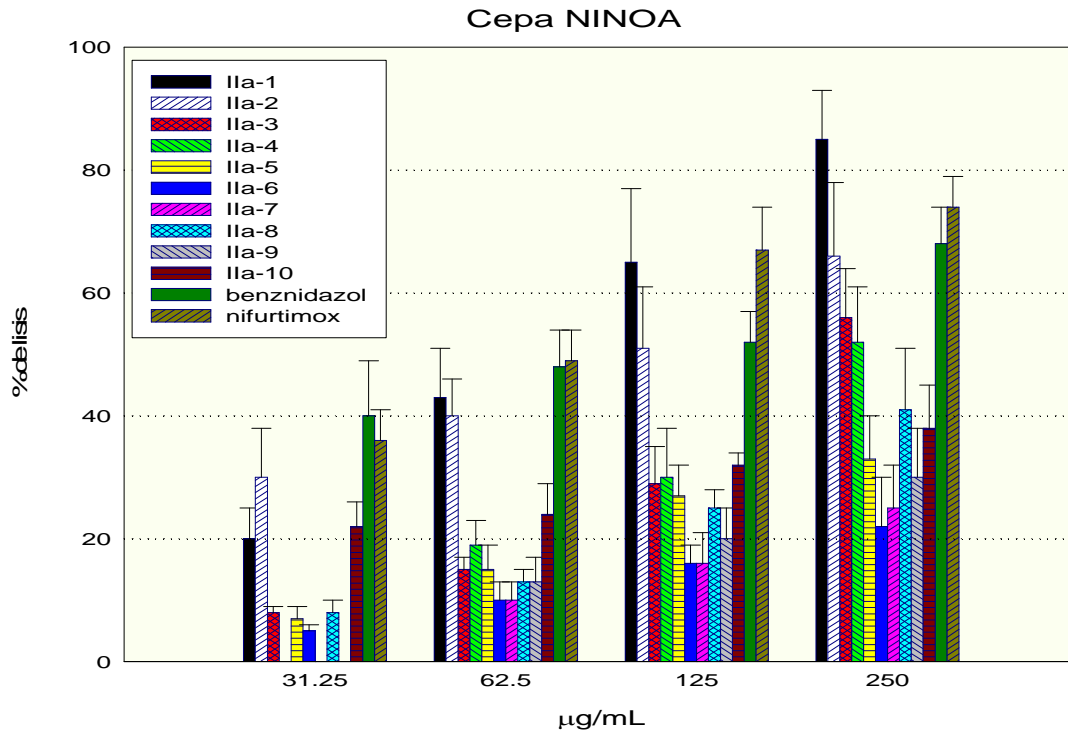


FIGURA 8. Porcentaje de lisis de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, cepa NINOA

Así como lo demostró el análisis estadístico (ver apéndice al final) hay una diferencia significativa ($P = <0.001$) entre los porcentajes de lisis obtenidos a las diferentes concentraciones. Por lo que podemos concluir se trata de un efecto dosis-respuesta. Se analizó por separado los diferentes compuestos dividiéndose en dos grupos: nitrados (grupo nitro NO_2 en la posición R_1) y no nitrados (H en la posición R_1).

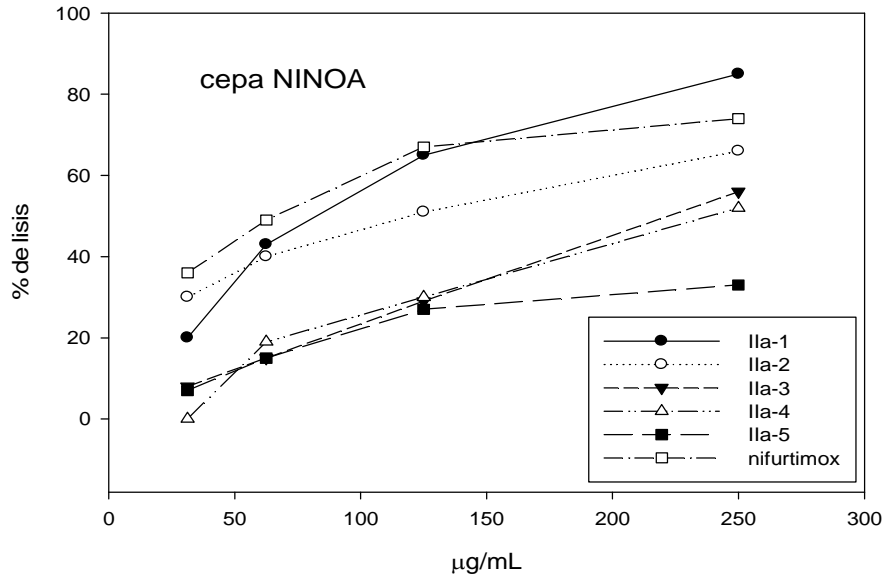


Figura 9. Efecto dosis-respuesta sobre la cepa NINOA de los diferentes compuestos con grupo nitro. Evaluados en el modelo *in vitro* a diferentes concentraciones se observa un efecto dosis-respuesta, al aumentar la concentración aumenta la lisis de los tripomastigotes sanguíneos.

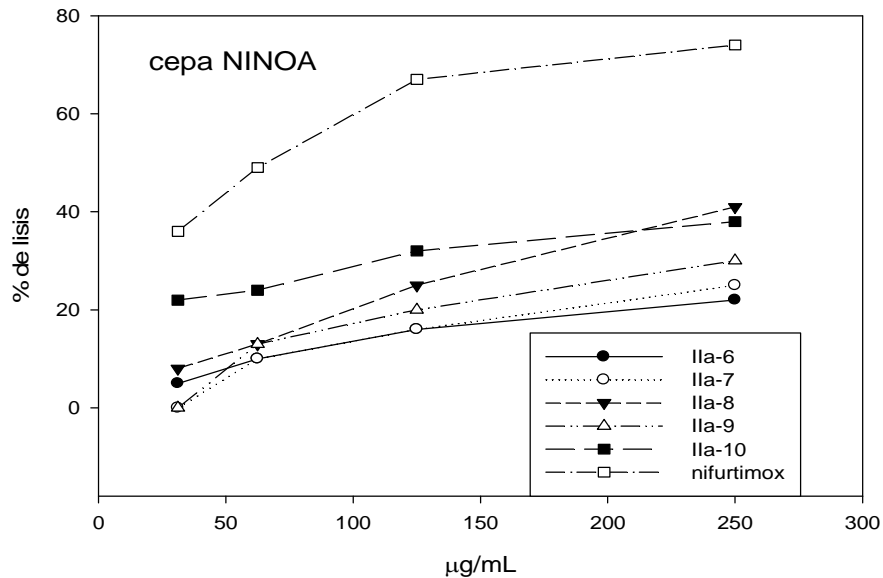


Figura 10. Efecto dosis-respuesta sobre la cepa NINOA de los diferentes compuestos sin grupo nitro. Evaluados en el modelo *in vitro* a diferentes concentraciones se observa un efecto dosis-respuesta, al aumentar la concentración aumenta la lisis de los tripomastigotes sanguíneos.

El valor de la CL_{50} (concentración del compuesto que causa la lisis del 50% de los parásitos) fue determinada trazando el porcentaje de reducción contra el logaritmo de la concentración del compuesto (Método de Probits).

Tabla 2. Determinación de CL₅₀ por el método de Probits para la cepa NINOA

COMPUESTO	ECUACIÓN DE LA RECTA	VALOR DE X	CL ₅₀ (µg/mL)
IIa-1	$y = 48x - 60.1$	2.29	195.9
IIa-2	$y = 34.66x - 55.1$	3.03	1,071.5
IIa-3	$y = 40x - 48.5$	2.46	288.4
IIa-4	$y = 46.66x - 62$	2.39	245.4
IIa-5	$y = 26x - 19.7$	2.68	478.6
IIa-6	$y = 35.66x - 30.8$	2.26	181.9
IIa-7	$Y = 45x - 54$	2.31	204.1
IIa-8	$y = 25.66x - 27.3$	3.01	1,023.3
IIa-9	$y = 26.33x - 32.6$	3.14	1,380.4
IIa-10	$y = 48.33x - 51.5$	2.10	125.9
BENZNIDAZOL	$y = 31.66x - 42.5$	2.92	831.8
NIFURTIMOX	$y = 35x - 34.5$	2.41	257.0

Para el caso de la cepa NINOA el nifurtimox obtuvo una CL₅₀ de 257 µg/mL y el Benznidazol de 831.8 µg/mL, pero como se observa en el cuadro 2 hubo cinco compuestos que obtuvieron la lisis del 50% del parásito a concentraciones menores a la de los fármacos de referencia; éstos fueron los derivados IIa-1, IIa-4, IIa-6, IIa-7 y IIa-10, el estudio también mostró mediante el método de Probits que el resto de los derivados presentaron sus concentraciones letales (CL₅₀) por arriba de 250 µg/mL que es la concentración más alta experimentada por la prueba de susceptibilidad *in vitro*, aún cuando 2 derivados (IIa-3 y IIa-5) presentaron su dosis letal debajo de la exhibida por el Benznidazol.

7.2 Observación de los tripomastigotes sanguíneos después de la evaluación *in vitro* y obtención del porcentaje de parásitos dañados de la cepa NINOA

Al término de la evaluación *in vitro* se realizaron extensiones sanguíneas de la sangre expuesta a la concentración dosis de 250 µg/mL de los compuestos de prueba ya que fue esta la concentración de mejor actividad tripanocida; y se revisaron al microscopio compuesto a 100x y se observó que los tripomastigotes sanguíneos que no se lisaron por efecto de los compuestos exhibieron cambios morfológicos como presencia de pequeñas vacuolas (algunos) e "hinchamiento"; por otro lado cabe mencionar que no se observaron alteraciones de este tipo en los eritrocitos y que tampoco se detectaron con los fármacos de referencia.

Tabla 3. Porcentaje de tripomastigotes sanguíneos de la cepa NINOA con alteraciones morfológicas

compuesto	Ila-1	Ila-2	Ila-3	Ila-4	Ila-5	Ila-6	Ila-7	Ila-8	Ila-9	Ila-10
%	78	21	34	68	42	92	58	46	8	73

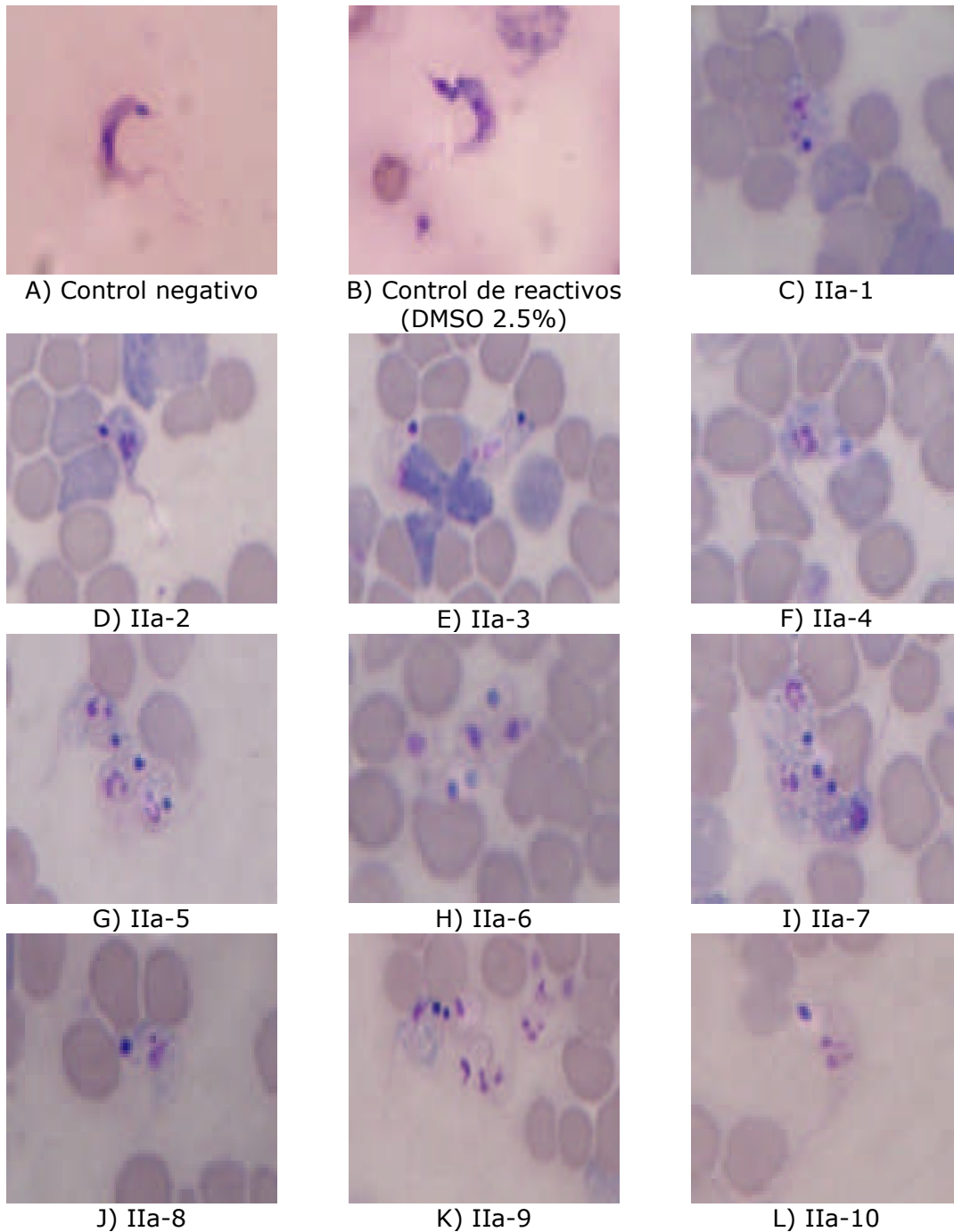


FIGURA 11. Observación de los tripomastigotes sanguíneos (100x) de la cepa NINO A . En la mayoría se observa un hinchamiento como alteración morfológica después de la incubación con los compuestos de prueba a la concentración de 250 mcg/mL por ser la de mejor actividad.

7.3 Actividad *in vitro* DE 1-{(5-R1-tiofen)metilen}-2-(o;p-R2) fenil hidrazona sobre el aislado INC-5 de *Trypanosoma cruzi*

El porcentaje de lisis de los tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* por efecto de los derivados de 1-{[(5-R1-tiofen)-2-il]- metilen}-2-(o;p-R2) fenil hidrazona sobre el aislado INC-5 se muestra en la Fig. 10

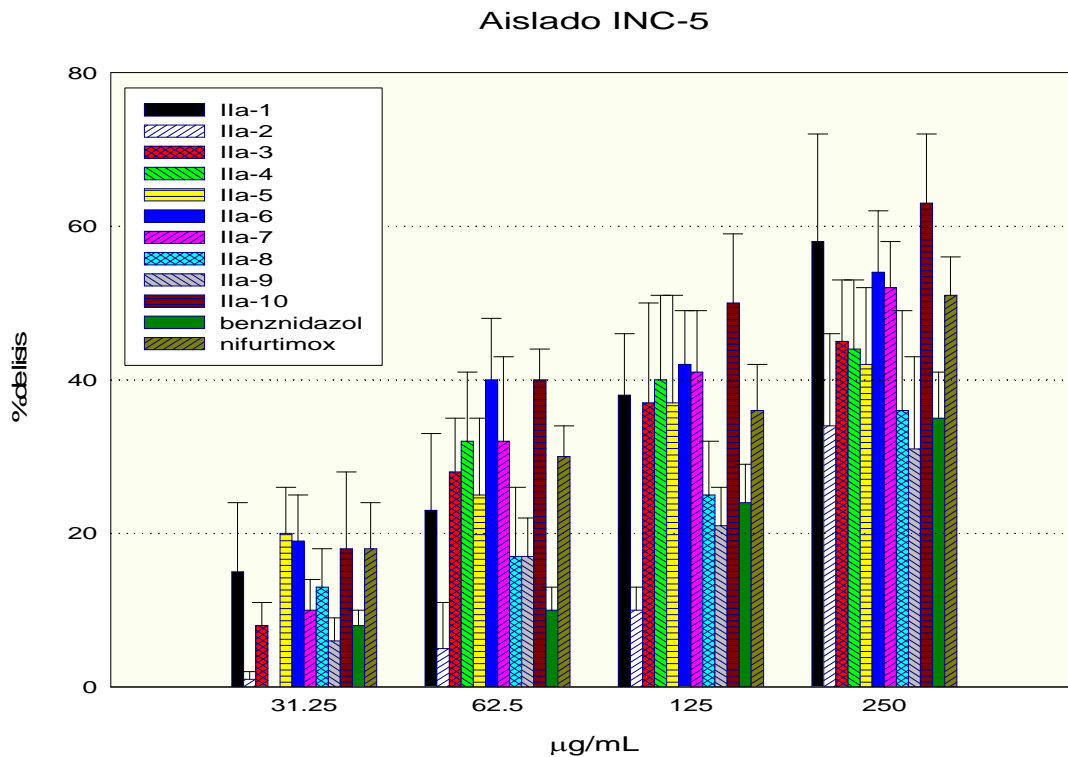


FIGURA 12. Porcentaje de lisis de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, aislado INC-5

Así como lo demostró el análisis estadístico (ver apéndice al final) hay una diferencia significativa ($P = <0.001$) entre los porcentajes de lisis obtenidos a las diferentes concentraciones. Por lo que podemos concluir se trata de un efecto dosis-respuesta. Se analizó por separado los diferentes compuestos dividiéndose en dos grupos: nitrados (grupo nitro NO_2 en la posición R_1) y no nitrados (H en la posición R_1).

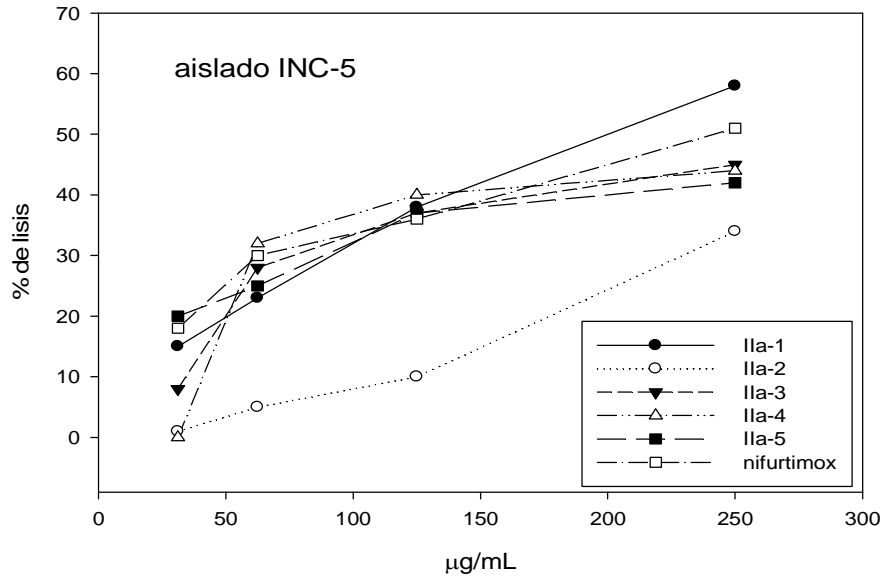


Figura 13. Efecto dosis-respuesta sobre el aislado INC-5 de los diferentes compuestos con grupo nitro. Evaluados en el modelo *in vitro* a diferentes concentraciones se observa un efecto dosis-respuesta, al aumentar la concentración aumenta la lisis de los tripomastigotes sanguíneos.

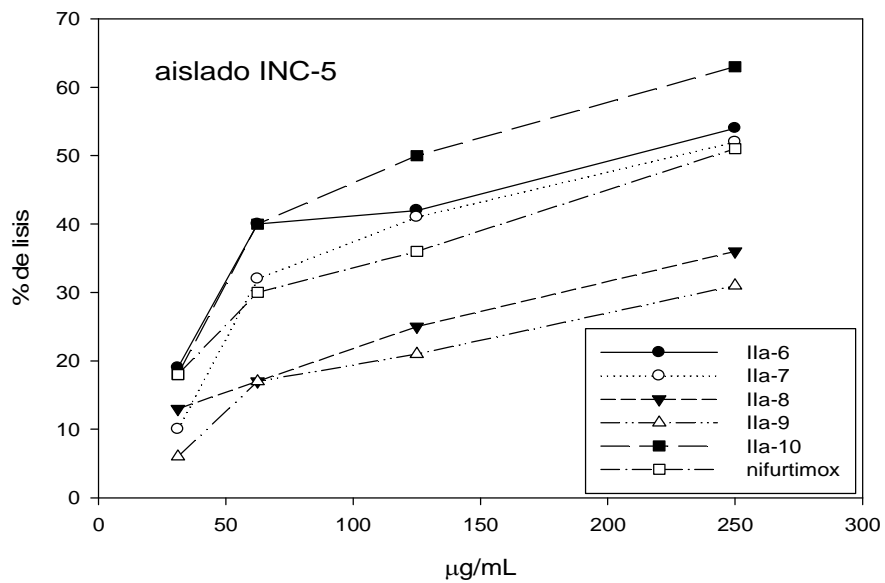


Figura 14. Efecto dosis-respuesta sobre el aislado INC-5 de los diferentes compuestos sin grupo nitro. Evaluados en el modelo *in vitro* a diferentes concentraciones se observa un efecto dosis-respuesta, al aumentar la concentración aumenta la lisis de los tripomastigotes sanguíneos.

Tabla 4. Determinación de CL₅₀ por el método de Probits para el aislado INC-5

COMPUESTO	ECUACIÓN DE LA RECTA	VALOR DE X	CL ₅₀ (µg/mL)
IIa-1	$y = 72.33X - 87.8$	1.90	79.4
IIa-2	$y = 39.66X - 30.6$	2.03	107.1
IIa-3	$y = 52.66X - 75.7$	2.39	245.5
IIa-4	$y = 55.66X - 83.3$	2.39	245.5
IIa-5	$y = 30X - 38$	2.93	851.1
IIa-6	$y = 19X - 23.8$	3.88	7,585.8
IIa-7	$y = 27X - 39.9$	3.33	2,137.9
IIa-8	$y = 37X - 50.4$	2.71	512.9
IIa-9	$y = 32.33X - 47.3$	3.01	1,023.3
IIa-10	$y = 18.66X - 7.4$	3.07	1,174.9
BENZNIDAZOL	$y = 29.33X - 5.2$	1.88	75.9
NIFURTIMOX	$y = 44X - 29.3$	1.80	63.1

El aislado INC-5 también fue más sensible al Nifurtimox mostrando una concentración letal (CL₅₀) de 63.1 µg/mL frente a una de 75.9 µg/mL del Benznidazol y a diferencia de la cepa NINOA ningún derivado mostró mejor actividad que los fármacos de referencia.

7.4 Observación de los tripomastigotes sanguíneos después de la evaluación *in vitro* y obtención del porcentaje de parásitos dañados del aislado INC-5

Al término de la evaluación *in vitro* se realizaron extensiones sanguíneas de la sangre expuesta a la dosis de 250 mcg/mL de los compuestos de prueba ya que fue esta la concentración de mejor actividad tripanocida; y se revisaron al microscopio compuesto a 100x y se observó que los tripomastigotes sanguíneos que no se lisaron por efecto de los compuestos exhibieron cambios morfológicos como presencia de pequeñas vacuolas (algunos) e "hinchamiento"; por otro lado al igual que en el experimento de la cepa NINOA no se observaron alteraciones de este tipo en los eritrocitos y que tampoco fueron vistos con los fármacos de referencia.

Tabla 5. Porcentaje de tripomastigotes sanguíneos del aislado INC-5 con alteraciones morfológicas

compuesto	IIa-1	IIa-2	IIa-3	IIa-4	IIa-5	IIa-6	IIa-7	IIa-8	IIa-9	IIa-10
%	79	68	56	65	38	27	30	54	32	43

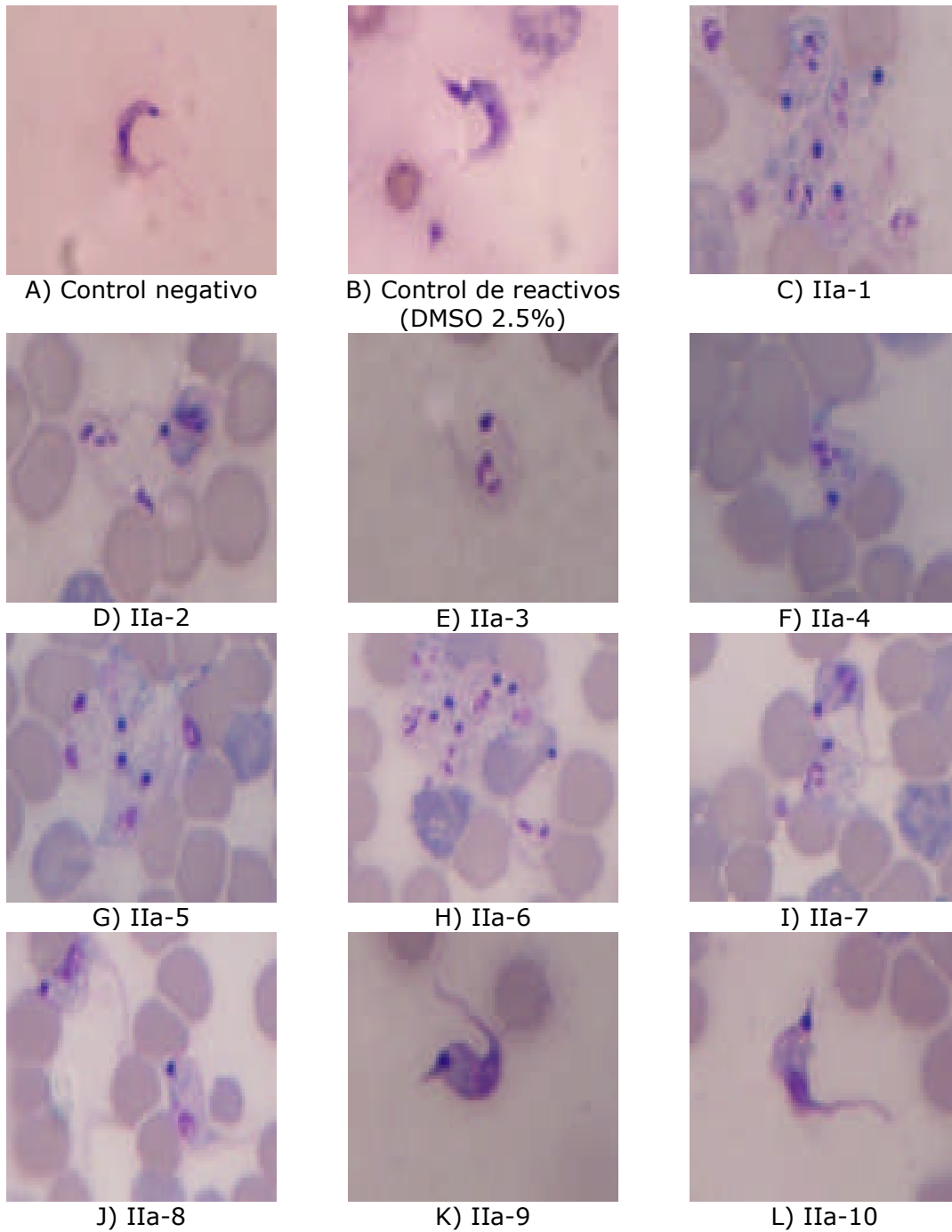


FIGURA 15. Observación de los tripomastigotes sanguíneos (100x) del aislado INC-5. En la mayoría se observa un hinchamiento como alteración morfológica después de la incubación con los compuestos de prueba a la concentración de 250 mcg/mL por ser la de mejor actividad.

Comparando las CL₅₀ obtenidas para ambas cepas observamos que la cepa NINOA es aproximadamente cuatro veces más sensible que la cepa INC-5 a la acción del nifurtimox. Los compuestos IIa-1, IIa-4, IIa-6, IIa-7 y IIa-10 presentaron una importante actividad tripanocida en comparación con el nifurtimox en la prueba *in vitro* y fueron preseleccionados para evaluarlos en el modelo *in vivo* a corto plazo por observarse sus CL₅₀ más bajas que el nifurtimox.

7.5 Actividad *in vivo* a corto plazo de *Trypanosoma cruzi* a diferentes compuestos activos

Se realizó como se describe en material y métodos administrando a los ratones infectados una dosis del compuesto (500 mg/Kg de peso) en el día que se observa un nivel de parasitemia alto y monitorear si esta sufre una reducción se utilizaron dos vehículos diferentes para obtener una mejor solubilidad de los compuestos de prueba.

Vehículo A)

- ◆ goma arábiga 5%
- ◆ DMSO ($\leq 2.5\%$)
- ◆ vol. final 0.2 mL

Vehículo B)

- ◆ goma arábiga 5%
- ◆ tween 80 ($\leq 1\%$) (Urbina *et al.*, 2002)
- ◆ vol. final 0.2 mL

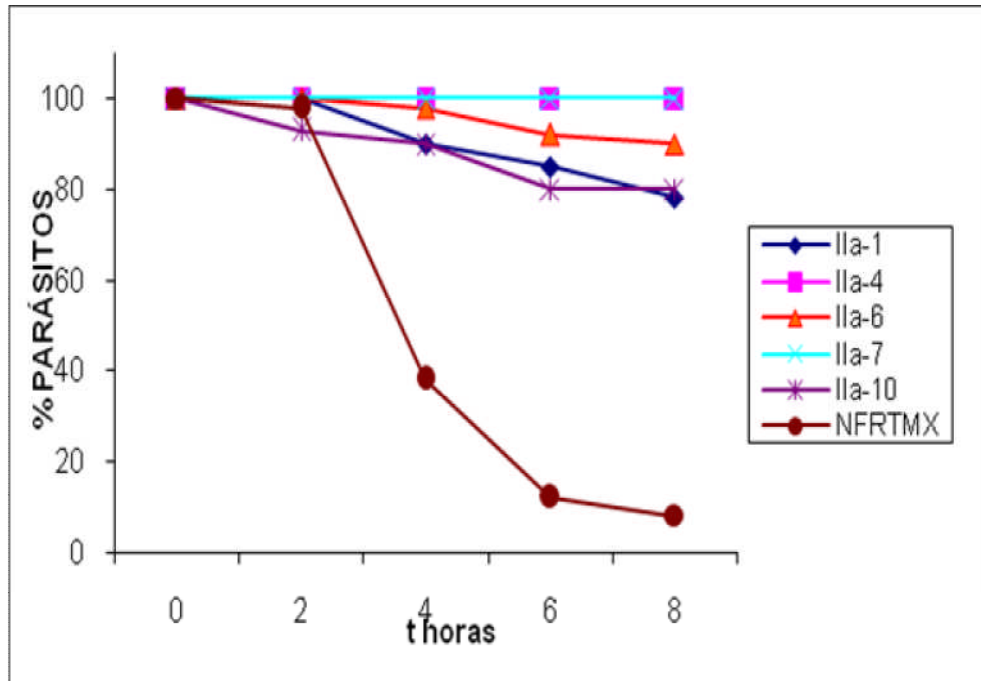


FIGURA 16. Disminución de parásitos de la cepa NINOA por el método de Brener (vehículo A)

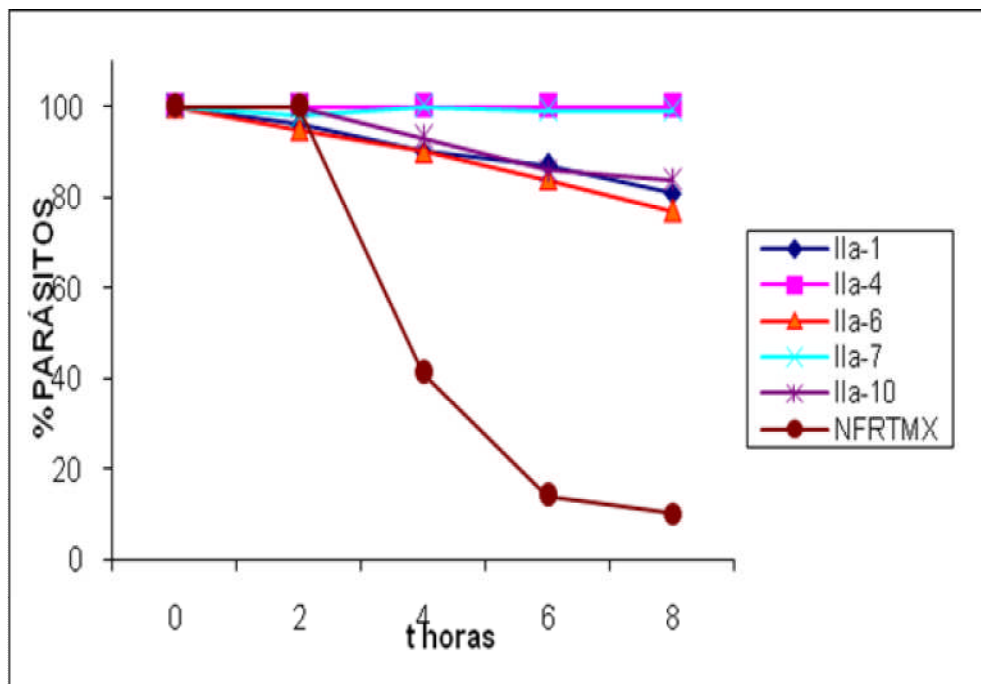


FIGURA 17. Disminución de parásitos de la cepa NINOA por el método de Brener (vehículo B)

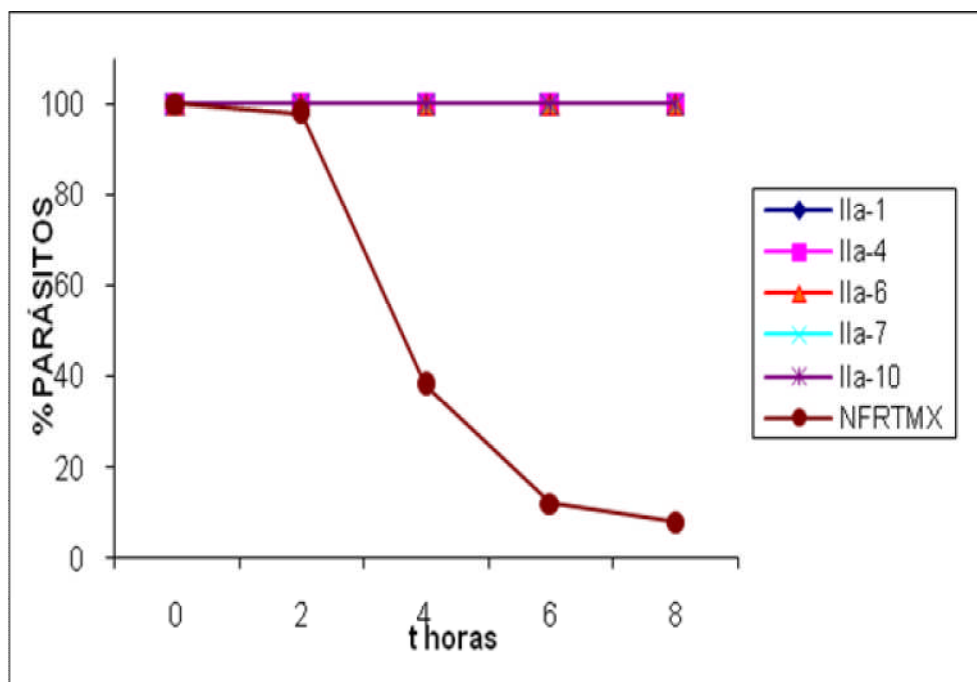


FIGURA 9. Disminución de parásitos del aislado INC-5 por el método de Brener (vehículo A)

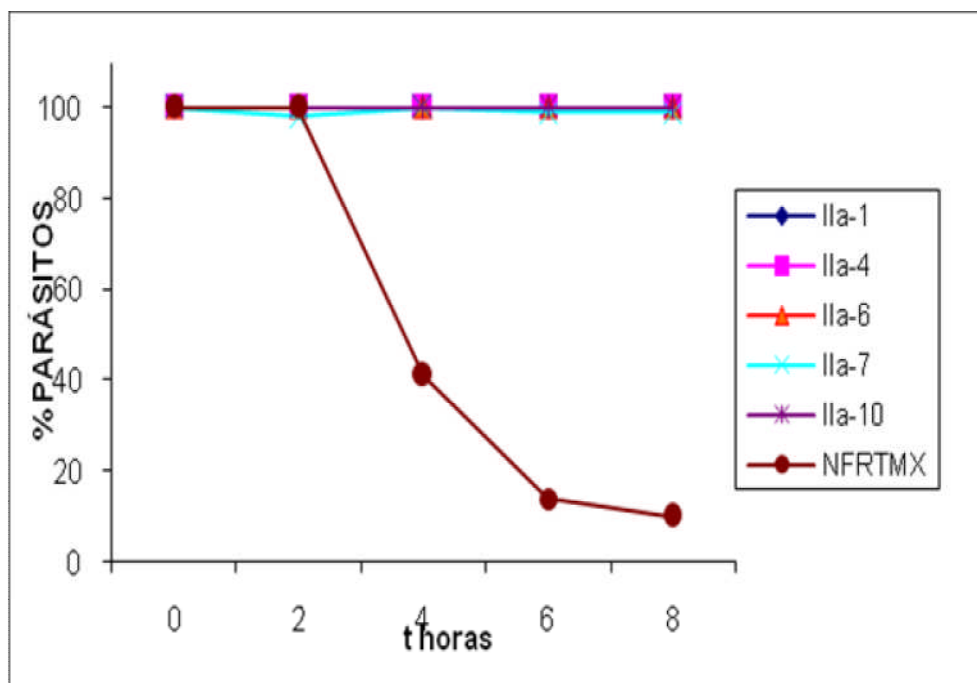


FIGURA 19. Disminución de parásitos del aislado INC-5 por el método de Brener (vehículo B)

En la evaluación *in vivo* a corto plazo los compuestos con mejor actividad *in vitro* (IIa-1, IIa-4, IIa-6, IIa-7 y IIa-10) fueron administrados oralmente a los ratones infectados utilizando primero el vehículo A para las dos cepas.

Solo los compuestos IIa-1, IIa-6 y IIa-10 mostraron actividad tripanocida para los ratones infectados con la cepa NINOA pero no hubo actividad detectable contra el aislado INC-5; el compuesto más activo fue el IIa-1 disminuyendo 22% la parasitemia, le siguió el IIa-10 con 20% de reducción y finalmente el IIa-6 con un 10%.

Se determinó que los compuestos IIa-1, IIa-6 y IIa-10 fueron los más activos en diferentes vehículos contra *T. cruzi* por lo que se estudió su probable actividad tripanocida a largo plazo. Se observó que la cepa NINOA en comparación con la cepa INC-5, es más sensible al efecto del nifurtimox, así como también lo fue con nuestros compuestos de prueba, por lo que el estudio del modelo a largo plazo se realizó con la primera.

7.6 Curva de parasitemia de la cepa NINOA de *Trypanosoma cruzi*

Se realizó como fue descrito en material y métodos (5.3.3) y se registró la parasitemia de los ratones infectados con la cepa NINOA. La cepa NINOA presentó dos picos máximos de parasitemia los días (19) y (24) post inoculación, con 106500 y 74000 tripomastigotes sanguíneos/ 5 mm³ respectivamente, un periodo prepatente de 6 días y un periodo patente de 67 días.

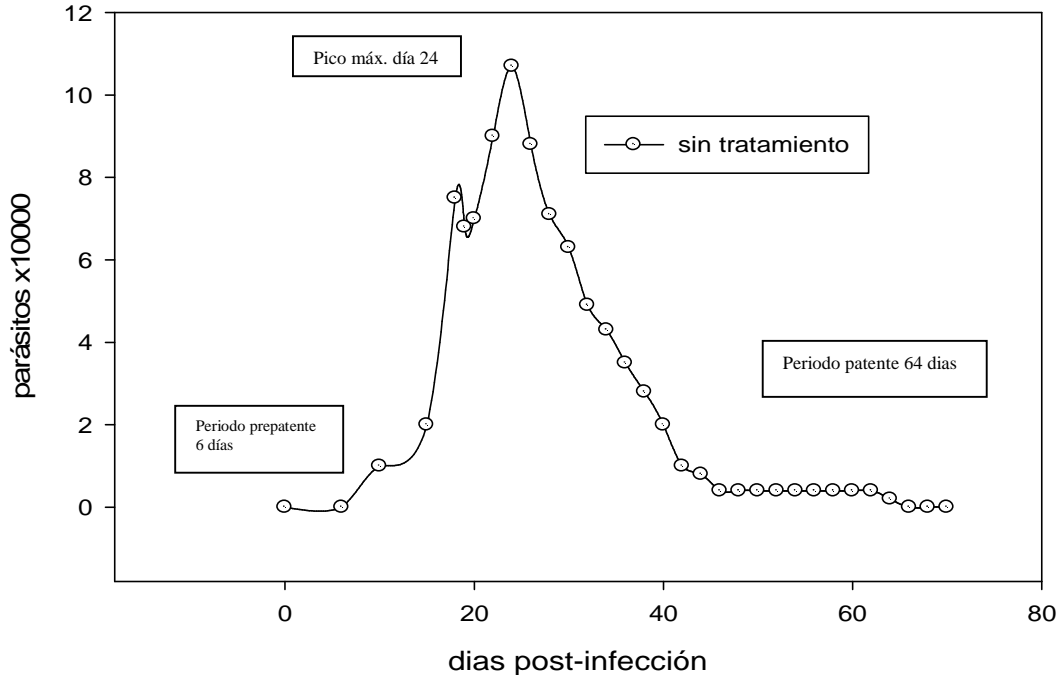


FIGURA 20. Curva de parasitemia de la cepa NINOA. Promedio de un lote de 5 ratones cepa CD-1 inoculados con 150 000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa NINOA de *T. cruzi*. La parasitemia se determinó por el método de Pizzi cada tercer día después del periodo prepatente.

7.7 Actividad *in vivo* a largo plazo de *Trypanosoma cruzi* a diferentes compuestos

Se indujo la infección de *Trypanosoma cruzi* a ratones CD1 inoculando por vía intraperitoneal 1.5×10^5 tripomastigotes sanguíneos y a partir del inicio del periodo patente (observación de parásitos en sangre periférica) se les administró por vía oral una dosis diaria de 100mg/kg de compuesto suspendido en goma arábica al 5% (Vehículo A) durante 15 días (Filardi and Brener, 1983; Boiani *et al*, 2007). Se utilizaron 5 ratones por cada compuesto y al lote testigo sólo se le suministró el vehículo. La parasitemia se determinó por el método de Pizzi cada tercer día después del periodo prepatente. Dicho modelo se realizó con la cepa NINOA por ser ésta más sensible tanto para el compuesto de referencia como para nuestros compuestos.

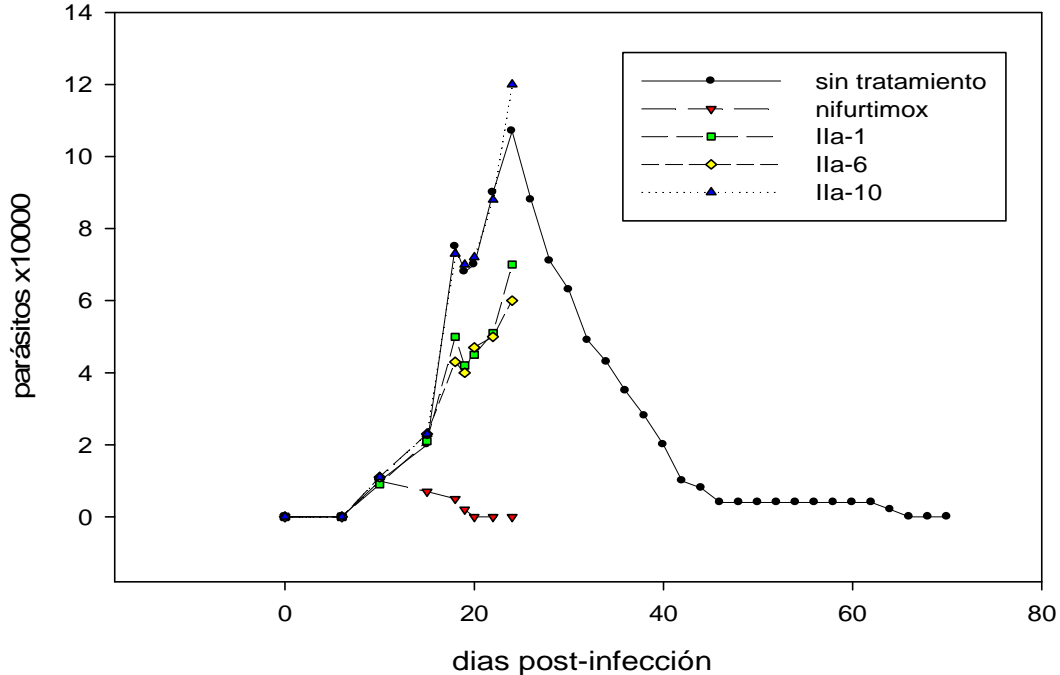


FIGURA 21. Evaluación *in vivo* del efecto tripanocida de los compuestos IIa-1, IIa-6 y IIa-10 en comparación con el nifurtimox sobre la cepa NINOA. Dosis de 100 mg/Kg administrado por vía oral diariamente durante 15 días en ratones CD1 inoculados con la cepa NINOA de *T. cruzi*. La parasitemia se determinó por el método de Pizzi (1957) cada tercer día.

En la evaluación *in vivo* a largo plazo observamos que la mejor actividad tripanocida fue con el compuesto IIa-6 con una reducción del 45.5% de la parasitemia en el pico máximo de la infección, seguido del compuesto IIa-1 con una reducción del 36.4% y por último el IIa-10 que no mostró disminución. Después de 15 días de tratamiento y al no ver la eliminación completa de la parasitemia con nuestros tres compuestos pero sí con el nifurtimox los ratones fueron sacrificados, tres de ellos para obtener los órganos ya mencionados (5.3.5), procesarlos con la técnica histológica y después se hizo la búsqueda de nidos de amastigotes.

7.8 Obtención e inclusión de órganos en parafina, técnica de hematoxilina-eosina y búsqueda de nidos de amastigotes

Una vez concluido el tratamiento se sacrificaron los animales, 3 fueron para la obtención e inclusión de órganos en parafina y obtener cortes histológicos de músculo cardíaco y de músculo esquelético; se observaron las preparaciones para la búsqueda de los nidos de amastigotes.

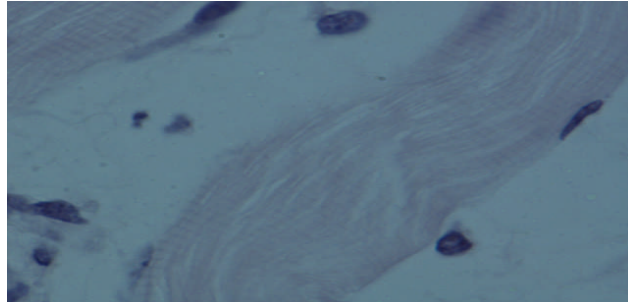


FIGURA 10. Corte histológico de corazón de ratón libre de infección (control negativo). Solo podemos observar fibras musculares de la histología normal del tejido cardíaco.

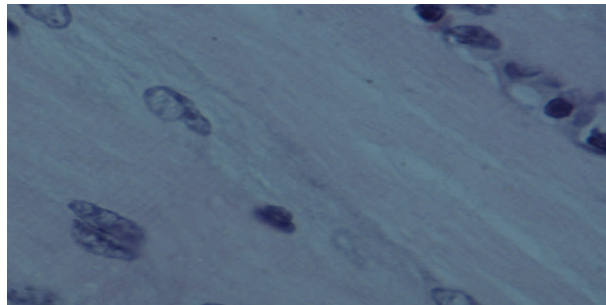


FIGURA 23. Corte histológico de corazón de ratón infectado con la cepa NINOA que recibió el tratamiento con el fármaco de referencia nifurtimox. Observamos la histología normal del corazón y no se detectó la presencia de nidos de amastigotes de *T. cruzi*.

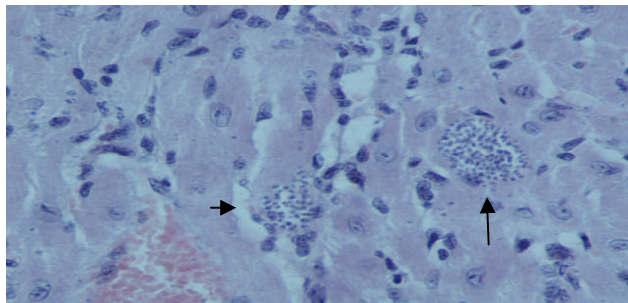


FIGURA 24. Corte histológico de corazón de ratón infectado con la cepa NINOA que recibió el tratamiento con el compuesto IIa-1. Se observaron nidos de amastigotes de *T. cruzi*.



FIGURA 25. Cortes histológicos de corazón de ratón infectado con la cepa NINOA que recibió el tratamiento con el compuesto IIa-6. Se observaron nidos de amastigotes de *T. cruzi* pero en mucho menor número y tamaño que en los otros tratamientos.

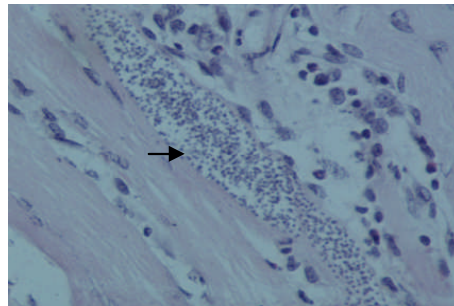


FIGURA 26. Corte histológico de corazón de ratón infectado con la cepa NINOA que recibió el tratamiento con el compuesto IIa-10. Se observaron nidos de amastigotes de *T. cruzi* en mayor tamaño y número que en los otros tratamientos.

En nuestro control negativo (ratón infectado que solo recibió el vehículo A) que también fue sacrificado al término del tratamiento se observaron nidos de amastigotes lo cuál nos hace sugerir que durante la fase aguda de la infección se lleva acabo el establecimiento de éstos, y no sólo en la fase crónica, por lo que podremos saber si los compuestos tienen acción sobre la forma intracelular del parásito. En los ratones que fueron tratados con nifurtimox no se observaron nidos de amastigotes, pero con nuestros compuestos no se eliminó dicha forma y solo se apreció que con el compuesto IIa-6, el tamaño y número de los nidos era menor en comparación con los demás compuestos

7.9 Cura parasitológica

Los otros 2 ratones sacrificados también fueron procesados para la extracción de músculo cardiaco para la siembra de medios de cultivo para verificar la cura parasitológica la revisión de los medios de cultivo fue a los 30 días post-inoculación.

compuesto	epimastigotes/mL
nifurtimox	0
IIa-1	2,591,400
IIa-6	1,110,600
IIa-10	4,442,400

La revisión de los medios de cultivo reafirma lo obtenido en el modelo in vivo a largo plazo mostrando que solo el compuesto de referencia nifurtimox logró la cura parasitológica eliminando no solo la fase extracelular tripomastigote sanguíneo sino también la fase intracelular amastigote.

8 DISCUSIÓN

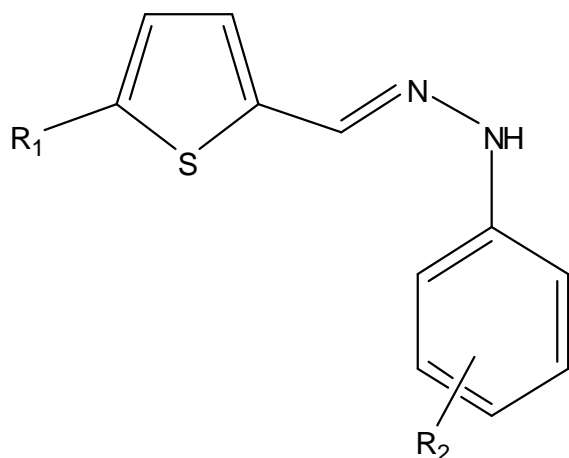
Aunque se han descrito casos en donde personas infectadas con *T. cruzi* no desarrollan enfermedad (la primera persona descrita con parasitemia nunca presentó la enfermedad de Chagas), y se reconoce que existe cura espontánea de la enfermedad, la gran mayoría de las personas desarrollan la enfermedad hacia un curso crónico (Dias *et al.*, 2008), cuyo tratamiento pueden representar hasta un costo de \$11,619 dólares por paciente, como es el caso en algunos países de Sudamérica (Castillo-Riquelme *et al.*, 2008). Además existe el consenso de expertos de que todo paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* debe recibir tratamiento anti-parasitario, a excepción de los enfermos crónicos terminales (Apt *et al.*, 2008), por lo anterior el tratamiento quimioterapéutico adquiere relevancia para el control de la infección.

Para el tratamiento de la fase aguda de la enfermedad de Chagas está indicada una quimioterapia específica utilizando los dos fármacos disponibles: nifurtimox y benznidazol (Coura y De Castro 2002; Apt *et al.*, 2008). Ambos fármacos son derivados heterocíclicos muy tóxicos con buena efectividad en la fase aguda, pero con muy poco porcentaje de cura de los casos crónicos.

La resistencia natural de *T. cruzi* a estos nitroderivados se ha sugerido como un importante factor para explicar las bajas proporciones de cura detectadas en pacientes chagásicos tratados (Brener *et al.* 1976).

Es por ello que en este trabajo se buscó el diseño de nuevos fármacos con actividad tripanocida y se evaluaron 10 compuestos derivados de 1- $\{[(5-R_1\text{-tiofen})\text{-}2\text{-il}]\text{-metilen}\}\text{-}2\text{-}(\text{o;p-R}_2\text{)fenil hidrazona}$ sobre las cepa NINOA y el aislado INC-5, dichos compuestos fueron sintetizados con el objetivo de guardar similitudes estructurales con el nifurtimox que es el fármaco de

referencia, cambiando el par de sustituyentes R₁ y R₂ en la estructura nitroheterocíclica.



COMPUESTO	R1	R2
IIa-1	H	p-Br
IIa-2		p-Cl
IIa-3		o-NO ₂
IIa-4		o-F
IIa-5		H
IIa-6	NO ₂	p-Br
IIa-7		p-Cl
IIa-8		o-NO ₂
IIa-9		o-F
IIa-10		H

Derivados de 1-[[[(5-R1-tiofen)-2-il]-metilen]-2-(o;p-R2) fenil hidrazona

Para el caso del sustituyente R₁ los elementos sustituidos fueron Hidrógeno (H) y el grupo nitro (NO₂), mientras que para R₂ fueron halógenos como el Bromo (Br), Cloro (Cl) y Fluor (F) así como también los sustituidos en R₁ (H y NO₂). Con estas variaciones lo que pretendemos es saber cuál de estos componentes presenta el efecto parasiticida y así poder abrir camino en el diseño de nuevos fármacos tripanocidas así como también definir si el grupo nitro (NO₂) en este tipo de compuestos (heterocíclicos nitrados) es al que realmente debe atribuirse el efecto parasiticida como lo mencionan otros autores (Maya *et al.*, 2006; D'ocampo and Stoppani, 1980), los cuales sugieren que la reducción intracelular de este tipo de compuestos generan el intermediario radical nitro-anión (R-NO₂⁻) y que después de una reacción redox se producen radicales libres del oxígeno (O₂⁻ y H₂O₂) que es el principal mecanismo de acción contra *T. cruzi*.

Se han reportado diferentes mecanismos de acción que tienen los nitroderivados en estos se incluyen:

- Acción directa de los radicales nitro-anión sobre macromoléculas, tales como el DNA (Kedderis and Miwa, 1988)
- Generación de radicales libres del oxígeno que son los principales agentes tóxicos en el caso del Nifurtimox (D'ocampo and Stoppani 1979)
- Producción de nitroso y derivados hidroxilamina que poseen una alta citotoxicidad (Edwards, 1993)
- Inhibición directa sobre la tripanotona reductasa encargada de unir otras enzimas y formas un sistema anti-oxidante contra radicales libres, peróxidos e hidroperóxidos. (Henderson *et al.* 1988),

Las actuales opciones terapéuticas disponibles para la enfermedad de Chagas son generalmente consideradas insatisfactorias. Debido a su significativa toxicidad, la quimioterapia con nifurtimox o benznidazol puede ser empleada solo bajo estricto control médico (Gorla *et al.* 1988). Aunque ambos fármacos acortan significativamente la fase aguda y disminuyen la mortalidad de la enfermedad de Chagas, ellos no erradican al parásito en 40% de los pacientes y no son usados durante la fase crónica de la enfermedad (Kirchhoff, 2000). En este estudio se seleccionaron la cepa NINOA y el aislado INC-5 de *Trypanosoma cruzi* con la finalidad de evaluar los compuestos en cepas con diferente susceptibilidad al nifurtimox.

Para ambos aislados se observó en el modelo *in vitro* una clara tendencia que a mayor concentración hay un mayor efecto lítico un claro ejemplo de efecto dosis-respuesta, también indicado por el análisis estadístico al saber que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes concentraciones utilizadas y todos mostraron su mejor actividad a la

concentración más alta probada por el método que fue de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por lo que suponemos se trata de un comportamiento de fármacos específicos; es de importancia aclarar que en el diseño de nuevos fármacos se realizan pruebas de toxicidad sólo si éstos cumplen el objetivo principal para el que fueron sintetizados; en este caso los nuevos derivados deben mostrar una actividad tripanocida considerable para así llevar a cabo una síntesis mayor de éstos y realizar los estudios antes mencionados y evitar gastos innecesarios.

Fueron seleccionados 5 de los 10 compuestos (IIa-1, IIa-4, IIa-6, IIa-7 y IIa-10) para ser evaluados en el modelo *in vivo* a corto plazo en el cual solo se detectó actividad en la cepa NINOA; nuestro principal problema fue la baja solubilidad de los compuestos y con el objetivo de modificar los probables factores que determinaron la nula actividad de los compuestos sobre el aislado INC-5 se cambió la composición del vehículo y basándonos en otros estudios de actividad *in vivo* (Urbina et al., 2002) formulamos y empleamos el vehículo B, el cuál no usa DMSO como disolvente sino tween 80 como surfactante para los compuestos y esperar así una mejor absorción pues suponemos se ve afectada esta. Los resultados obtenidos a la modificación del vehículo (Fig. 18 y 19) dejan claro que el aislado INC-5 no presentó actividad a nuestros compuestos de prueba, y que los compuestos IIa-1, IIa-6 y IIa-10 son los únicos con actividad tripanocida.

Nuestros resultados muestran que la actividad tripanocida mostrada por los nuevos derivados es distinta para los dos aislados estudiados y consideramos eso como una desventaja porque el objetivo es diseñar un fármaco tripanocida con actividad contra las diferentes cepas del parásito. En la evaluación del modelo *in vivo* a largo plazo pudimos observar diferencias de la susceptibilidad de la cepa NINOA a los diferentes compuestos mediante la disminución de la parasitemia, sin embargo, los trabajos pioneros de Zigmar

Brener demostraron que la eliminación de la parasitemia no es un criterio concluyente para establecer la cura en los ratones tratados con algún medicamento. Ya que observó nidos de amastigotes en el 13% de los animales que ya no presentaban parasitemia y que habían sido considerados como curados (Brener *et al.*, 1969).

Por lo anterior, terminado el tratamiento los ratones fueron sacrificados para hacer cortes histológicos y observar si aún presentaban nidos de amastigotes. Se observó la presencia de nidos de amastigotes en el músculo cardiaco en los ratones sin tratamiento, así como en los derivados evaluados y solo pudieron detectarse alteraciones en el número y tamaño de los nidos con el compuesto IIa-6 que fue el que redujo la parasitemia en mayor medida (45.5%) mientras que con el fármaco de referencia nifurtimox no se observaron nidos de amastigotes.

Solo en los ratones que recibieron el tratamiento con nifurtimox se eliminó la parasitemia y tampoco se observaron nidos de amastigotes en los cortes histológicos y al ser sembrados los macerados del órgano como era de esperarse no fueron detectadas las formas epimastigotes y por el contrario con los órganos de los ratones que recibieron tratamiento con los otros compuestos (IIa-1, IIa-6 y IIa-10) y que no se eliminó la parasitemia ni tampoco los nidos de amastigotes, sí se detectaron epimastigotes en los medios de cultivo ya que el comportamiento de los amastigotes siguió un patrón similar a lo observado previamente por otros autores y es que los amastigotes que se encuentran en forma extracelular en los medios de cultivo incubados a 27 °C se diferencian a epimastigotes (Engel, *et al.*, 1988).

Los resultados obtenidos en esta prueba *in vivo* sugieren que nuestros derivados de la fenil hidrazona no son buenos candidatos para fármacos contra la enfermedad de Chagas ya que no eliminan la parasitemia ni los nidos de amastigotes.

Finalmente podemos concluir que nuestros resultados de el modelo in vivo comparados con el modelo in vitro son semejantes, ya que la cepa NINOA observamos que es más sensible que el aislado INC-5 en ambos modelos. Por lo que la prueba *in vitro* nos brinda pronóstico cercano de lo que puede obtenerse en una prueba *in vivo*.

9 CONCLUSION

- De los 10 compuestos derivados de la fenilhidrazona 5 de ellos (IIa-1, IIa-4, IIa-6, IIa-7 y IIa-10) presentaron actividad tripanocida sobre la cepa NINOA en el modelo *in vitro*, comparable con los fármacos de referencia entre el intervalo de 31.25, 62.5, 125 y 250 µg/mL de concentración.
- El compuesto IIa-1 fue el único que presentó actividad tripanocida *in vitro* en las 2 cepas estudiadas (INC-5 y NINOA).
- Tres de los compuestos derivados de la fenilhidrazona (IIa-1, IIa-6 y IIa-10) presentan actividad tripanocida en el modelo *in vivo* a corto plazo con la cepa NINOA de *T. cruzi*, pero todos ellos por debajo de la exhibida por el compuesto de referencia nifurtimox.
- En el modelo *in vivo* a largo plazo solo dos compuestos (IIa-1 y IIa-6) presentaron actividad tripanocida con la cepa NINOA.
- El compuesto IIa-6 fue el que tuvo mejor actividad tripanocida en el modelo *in vivo* a largo plazo, redujo 45.5% la parasitemia en el pico máximo y el compuesto IIa-1 redujo 36.4%.
- Ninguno de nuestros compuestos evaluados logró la cura parasitológica como lo hizo el fármaco de referencia nifurtimox.

PERSPECTIVAS

Es de interés relevante seguir haciendo modificaciones estructurales a diversos compuestos en busca de acercarnos a un tratamiento efectivo de la enfermedad de Chagas, como podría ser la mezcla de compuestos ya activos en un sólo tratamiento buscando un sinergismo de éstos y acercarnos a la cura parasitológica mejorando entonces la situación de un gran problema de salud pública del cual debemos profundizar en las múltiples realidades que aún no conocemos.

10 BIBLIOGRAFIA

Apt B., Werner H., Heitmann G., Ingrid, Jercic L., Muñoz C., Noemí H., San Martín V., Sapunar P., Torres H., Zulantay A. (2008). Guidelines for the Chagas disease: Part VI. Antiparasitic treatment for Chagas disease. *Rev. chil. infectol.*, 25(5):384-389.

Aufderheide A., Salo W., Madden M., Streit J., Buikstra J., Guhl F., Arriaza B., Renier C., Wittmers Jr. L., Fornaciari G., Allison M., 2004. A 9000-year record of Chagas' disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2034–2039.

Boiani L., Davies C., Arredondo C., Porcal W., Merlino A., Gerpe A., Boiani M., Pacheco J., Basombrío M., Cerecetto H. and González M. 2008. *In vivo* studies of 5-arylethenylbenzofuroxans in acute murine models of Chagas disease. *Eur. Jour. of Medi. Chem.* 1-9.

Botero D. and Restrepo M. 2003. *Humans Parasitosis*. 4^a ed., Corporation for Biologycals Research's. 213.

Brener Z., Costa C. and Chiari C. 1976. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 18:450-455.

Brener Z., Costa C. and Chiari C. 1984. Recent advances in Biochemistry of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79:Suppl.:149-155.

Cañas M. 2006. Novedades en los medicamentos para el Chagas, nifurtimox y benznidazol. *Boletín Fármacos* 9(1) disponible en: www.boletinfarmacos.org/062006/etica_y_medicamentos.htm .

Castillo-Riquelme M., Guhl F., Turriago B., Pinto N., Rosas F., Florez M., Martinez F., Fox-Rushby J., Davies C., Campbell-Lendrum D. 2008. The Costs of Preventing and Treating Chagas Disease in Colombia. *Plos. Negl. Trop. Dis.* 2(11): e336. doi:10.1371/journal.pntd.0000336

Castro J. and Diaz de Toranzo E. 1988. Toxic effects of nifurtimox and benznidazol two drugs used American Trypanosomiasis (Chagas disease). *Biomed. Environ. Sci.* 1:19-33.

Cevallos A. y Hernández R. 1997. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana), Cap. 15. Microbios Editores: Martínez Romero. E. y Martínez Romero, J. Ed. Centro de Investigación sobre fijación de nitrógeno, UNAM. México.

Coura R. and De Castro S. 2002. A critical review on Chagas Disease Chemoterapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97(1):3-24.

Cruz-Reyes A. y Pickering-López J. 2006. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years - A Review *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* Rio de Janeiro Vol. 101(4): 345-354.

D'ocampo R. 1980. Generation of free radicals from nifurtimox in *Trypanosoma cruzi* and in the mammalian host. The host invader interplay. Elsevier-North Holland: Amsterdam, 677-681.

D'ocampo R. 1981. Biochemical and ultrastructural alterations produced by miconazole and econazole in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 3:169-180.

D'ocampo R. and Stoppani A. 1979. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. Arch. Biochem Biophys. 197: 317-321.

De Souza W. 2002. Review from the cell biology to the development of new chemoterapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. Kinetoplastid biology and disease. Vol 1, no.3 disponible en: <http://www.kinetoplastids.com/content/1/1/3>.

Dias J., Silveira A. and Schofield C. 2002. The impact of Chagas disease Control in Latin-America- A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2002; 97(5):603-612.

Dias J., Dias E., Filho O., Vitelli-Avelar D., Correia D., Lages E., Prata A. 2008. Further evidence of spontaneous cure in human Chagas disease. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2008 sep.-oct. 41(5):505-6.

Du X., Guo C., Hansell E., Doyle O., Caffrey C., Holler T. 2002. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. J. Med. Chem. 45(13): 2695-707.

Edwards D. 1993. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. J. Antimicrob. Chemother. 31: 9-20.

Engel J. and Dvorak J. 1988. *Trypanosoma cruzi* : Cell biological behavior of epimastigote and amastigote forms in axenic cultures. J. Protozool. 35:513-518.

Estrada E., Peralta Z. y Rivas M. 1982. Manual de técnicas histológicas. AGT editor, S.A. México, pp 140.

Filardi L. and Brener Z. 1983. A rapid method for testing *in vivo* the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79:221-225.

Gorla N., Ledesma G., Barbieri and Larripa I. 1988 Assessment of cytogenetic damage in chagasic children treated with benznidazole. Mutat Res 206:217-220.

Guzmán-Bracho 2001. Epidemiology of Chagas disease in México: an update. Parasitology Today (2001); 17(8): 372-376.

Henderson G., Ulrich P., Fairlamb A., Rosenberg I., Pereira M. and Sela M. 1988. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulphide reductase; alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 5374-5378.

Hoffman C. 1928. Nota acerca de un probable transmisor de la tripanosomiasis humana en el Estado de Veracruz. *Rev. Mex. Biol.* 8: 12-18.

INEGI 2000. <http://www.inegi.gob.mx/inegi/default.asp>

Kedderis G. and Miwa G. 1988. The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. Drug Metab Rev. 19: 32-62.

Kirchhoff L. 2000. *Trypanosoma* species (American Trypanosomiasis, Chagas disease): biology of trypanosomes. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. New York: Churchill Livingstone, 2000; 2845-53.

Lanzer M., Gross U. and Moll H. 1997. Mechanisms of parasite persistence and Immune evasion. Parasitology Today 13:1-3.

López-Antuñano F. 1997. Quimioterapia de las infecciones producidas por *Trypanosoma cruzi*. Salud Pública de México. 39:463-471.

Lugones H., Peralta F. y De Marteleur A. 1969. Evaluación de la sintomatología clínica y la función hepática en la enfermedad de Chagas aguda tratada con Bay 2502. *Bol. Chil. Parasitol.* 24:19-24.

Mady C., Ianni B., de Souza J. (2008). Benznidazole and Chagas disease: can an old drug be the answer to an old problem?. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2008 Oct;17(10):1427-33.

Marreto J. and Andrade S. 1994. Biochemical behaviour of *Trypanosoma cruzi* strains isolation from mice submitted to specific chemotherapy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 27:209-215.

Maya J., Bollo S., Núñez-Vergara L., Squella A., Repetto Y., Morello A., Perié and Chauvière G. 2003. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives. *Biochemical Pharmacology.* 65: 999-1006.

Mazzotti L. 1940. Dos casos humanos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. *Gac Med México* 70: 417-420.

Menna-Barreto R., Laranja G., Silva M., Coelho M., Paes M., Oliveira M. and de Castro S. 2008. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. *Parasitol Res.* 103:11-117.

Montalvetti A., Bailey B., Martin M., Severin G., Oldfield E., D'ocampo R. 2001. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. *J. Biol. Chem.* 276(36): 33930-37.

Moraes-Souza H. and Bordin J. 1996. Strategies for Prevention of Transfusion-Associated Chagas' Disease .*Trans. Med. Rev.* 10:161-170.

Moya P., Paolasso R., Blanco S., Lapasset M., Sanmartino C. y Baso B. 1985. Tratamiento de la enfermedad de Chagas con nifurtimox durante los primeros meses de vida. *Medicina* 45:553-558.

Oliveira B., Ana F., Alves A., Romantha, Prado M., de Souza J. and Alves J. 2003. In vitro evaluation of Aromatic Nitrocompounds against *T. cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98: 1-4.

Organización Panamericana de la Salud. 2002. Modelo de guía clínica y formulario para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Washington DC: OPS/OMS/.OPS/HCP/HCT/210.2002.

Pepe A., Paulo C., Batista J., Fernández S. and Albuquerque S. 2004. Trypanocidal activity of Meliaceae and Retaceae plant extracts. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99:1-5.

Petray P., Morilla M., Corral R. and Romero E. 2004. *In vitro* activity of Etanidazole against the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro 99(2):233-235.

Pinto-Dias J. 1984. Acute Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 79 (suppl): 85-91.

Pizzi T. 1957. Inmunología de la enfermedad de Chagas. Santiago, Universidad de Chile. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 4:389-396.

Polak A. and Richle R. 1978. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. Ann. Trop. Med. Parasitol. 72: 45-54.

Raaflaub J. and Ziegler W. 1976. Information of Pharma Research Department and Department of Clinical Investigation and development. Basilen: F. Hoffmann-La Roche and Co.

Reather W., Michel R., Uphoff M. 1988. Effects of dimethylsulfoxide and the deep-freezing process on the infectivity, motility and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. 74:307-313.

Reyes P., Monteón V., Hernández B. 1999. The risk of transfusion, transmission of Chagas disease in México, City. Transfusión. 40,613.

Rodríguez-Morales A. 2005. Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas. Rev Perú Med Exp Salud Pública 22(2): 123-133.

Souza S., Takahashi C. and Da Silva J. 1991. Evaluation of the mutagenic potential of the antichagasic drugs Rochagan in healthy and chagasic rodents. Mutat. Res. 259:139-145.

Stoppani A. 1999. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. Medicina (B Aires); 59 (Suppl 2): 147-65.

Tapia-Conyer J., Gutiérrez S., Sepúlveda C., 1992. Metodología de la Encuesta Nacional Seroepidemiológica. Salud Pública de México, 1992, 119.

Tay J., Lara R., Velasco O., Gutiérrez M. 2002. Parasitología Médica. 7ª edición. Méndez Editores. México D.F. p. 123-145, 203-227.

Toledo M., Mendes I., Martins H., Lana M., Bahia M., Martins-Filho O., Tibayrene M. and Tafuri W. L. 1999. Impact of the genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* on its susceptibility to Benznidazole *in vivo*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 94(II):224.

Tyler K. and Engman D. 2001. The cycled of *Trypanosoma cruzi* revisited. Journal Parasitology 31: 472-481.

Urbina J. A. 1997. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. Parasitology 114:S91-S99.

Urbina J., Payares G., Sanoja C., Lira R. and Romanha A. 2002. *in vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. International Journal of Antimicrobial Agents 21(2003) 27-38.

Vidal, A., Ibañez B., Martínez C. 2000. Infección Natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociado a la vivienda humana en México. Salud Pública de México. 42, 496-503.

World Health Organization 2002. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. Technical Report Series. vol. 905.

World Health Organization Progress 1995-1996: Thirteenth programme report on the UNDP/World Bank/WHO special programme for Research and Training Tropical Diseases, 1997; 112,113.

Zaidenberg A., Tournier H., Schinella G. y Buschiazzi H. 2000. *Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. Revista Latinoamericana de Microbiología (2000) 42:21-26.

Zaidenberg, A., Tournier H., Schinella G. y Buschiazzi H. 1995. *Trypanosoma cruzi*: Influencia del plasma humano en la morfogénesis de tripomastigotes sanguíneos en un medio de cultivo acelular. Rev Lat-Amer. Microbiol. 37:71-77.

APENDICE

Análisis estadístico de los valores de porcentaje de lisis a las diferentes concentraciones del método *in vitro*.

Análisis de Varianza para mediciones repetidas por el método de Friedman.

Cepa NINOA

Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks

Normality Test: Failed (P < 0.050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
mediciones a 31.25 µg/ml	36	3	8.000	0.000	22.000
mediciones a 62.5 µg/ml	36	3	17.000	13.000	34.250
mediciones a 125 µg/ml	36	3	29.000	21.750	43.500
mediciones a 250 µg/mL	36	3	43.000	30.750	64.500

Chi-square= 99.000 with 3 degrees of freedom. (P = <0.001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001)

Cepa INC-5

Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks

Normality Test: Failed (P < 0.050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
mediciones a 31.25 µg/ml	36	3	11.000	5.750	18.000
mediciones a 62.5 µg/ml	36	3	26.000	17.000	35.000
mediciones a 125 µg/ml	36	3	37.000	24.750	43.000
mediciones a 250 µg/mL	36	3	46.000	35.750	53.250

Chi-square= 93.823 with 3 degrees of freedom. (P = <0.001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001)