

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

ESTUDIO DE SINERGISMO DE NUEVOS FÁRMACOS TRIPANOCIDAS BENIDIPINA Y CLOFAZIMINA CON BENZNIDAZOL EN UN MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Areco Blanco, Yesica Elizabeth – LU.1050879

Licenciatura en Biotecnología

Tutores:

**Dra. Alba Soto, Catalina, Instituto de Microbiología y Parasitología Médica
de la Universidad de Buenos Aires/ CONICET. Departamento de
Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina. UBA**

**Dra. Sbaraglini, María Laura, Laboratorio de Investigaciones y Desarrollo
de Bioactivos, Facultad de Ciencias Exactas UNLP**

Co-Tutor:

Cardozo, Julián, Universidad Argentina de la Empresa

Colaboradores:

**Dra. Carolina Bellera ¹, Dr. Bruno Buchholz ², Dra. Carolina Carillo ³, Dr. Ricardo
Gelpi ⁴, Lic. Jazmín Kelly ⁵, Lic. Cristian Miranda ⁶, Dr. Alan Talevi ⁷**

**¹⁻⁷ Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos, Facultad de Ciencias
Exactas UNLP; ²⁻⁴⁻⁵ Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de
Patología, Facultad de Medicina, UBA; ³ Instituto Cesar Milstein; ⁶ Instituto de
Microbiología y Parasitología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos
Aires**

Sep 8, 2017



UADE

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Agradecimientos

▣ A la **Dra. Catalina Alba Soto**, por darme lugar en el proyecto, por darme espacio en su laboratorio, por la orientación, por el apoyo brindado, por su confianza y la supervisión continua de la misma.

▣ A la **Dra. María Laura Sbaraglini**, por darme lugar en este proyecto, por su paciencia, por su dedicación, motivación y por las charlas compartidas tanto dentro como fuera del laboratorio.

▣ A la **Facultad de Medicina - Instituto de Microbiología y Parasitología Médica de la Universidad de Buenos Aires**, por los medios para realizar esta tesis.

▣ Al **Lic. Julian Cardozo**, por el apoyo brindado a lo largo de la carrera, por los conocimientos brindados y por la predisposición incondicional de estos últimos años.

▣ A la **Dra. Carolina Carrillo, Dr. Ricardo Gelpi, Dr. Bruno Buchhol y Lic. Jazmín Kelly**, por su inmensa ayuda en los ensayos experimentales y abrirnos las puertas en el Instituto Cesar Milstein e Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, respectivamente.

▣ A la **Dra. Carolina Bellera, Dra. Agustina Pino, Lic. Cristian Miranda y Dr. Alan Talevi** por la sabiduría, la paciencia, las horas compartidas y el apoyo que me brindaron durante la realización de este trabajo

▣ A **mi mamá**, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por haberme apoyado en todo momento, por la motivación constante pero más que nada por su amor leal en cada paso de mi vida. Por ser mi mejor compañera en mis momentos de crisis y en mis momentos de paz

▣ A **mis amigos/hermanos** por creer en mí y por compartir conmigo los buenos y malos momentos de la vida. Algunos están aquí conmigo y otros en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por bancarme siempre.

Resumen

La enfermedad de Chagas es una enfermedad causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*. Las terapias actuales para dicha enfermedad se basan en solo dos fármacos: el benznidazol y el nifurtimox, ambos con numerosos efectos adversos y limitada efectividad en la etapa crónica de la enfermedad, por lo que existe una necesidad en el desarrollo/búsqueda de nuevas terapias tripanocidas.

En investigaciones previas se seleccionaron, usando metodologías *in silico*, dos fármacos como posibles candidatos para el tratamiento contra la enfermedad de Chagas. Ambos fueron luego ensayados *in vitro* e *in vivo*, en modelos murinos agudos y crónicos de esta enfermedad. Teniendo en cuenta estos resultados, se plantea como objetivo de este trabajo estudiar la combinación de estos compuestos (clofazimina y benidipina) con benznidazol (fármaco de referencia) en un modelo experimental murino de infección crónica de la enfermedad de Chagas.

Para llevar a cabo el trabajo se utilizaron ratones C3H/HeN^k infectados con la cepa de *T. cruzi* K98, que no es letal en la etapa aguda de la enfermedad, pero produce alteraciones en el músculo esquelético y cardíaco en la etapa crónica. Los animales se dividieron en cinco grupos para la administración de los tratamientos, a saber: tratados con benznidazol (75mg/kg/día), con benznidazol (30mg/kg/día), con clofazimina (30mg/kg/día) y benznidazol (30mg/kg/día), con benidipina (15mg/kg/día) y benznidazol (30mg/kg/día) y animales sin tratamiento (vehículo). Se registró la evolución del peso corporal y el estado general de los animales durante todo el experimento. Asimismo, se realizaron electrocardiogramas (ECG) al finalizar los 30 días de tratamiento y previo a la eutanasia de los animales. Además, se determinó la carga parasitaria en los tejidos más afectados mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), así como también estudios histopatológicos de los músculos estriados. Al analizar los resultados, se encontró que los parámetros frecuencia cardíaca y la duración de los intervalos RR, QT y RP determinados en el ECG no registraron diferencias significativas de los distintos grupos. Sin embargo, el intervalo QRS mostró morfología aberrante en el total de los animales tratados con benznidazol 75mg/kg/día. Por otra parte, se encontró que la administración de estos fármacos en combinación (clofazimina + benznidazol; benidipina + benznidazol) ayudan a reducir la carga parasitaria

en algunos tejidos, como así también mostró un efecto beneficioso a nivel inflamatorio respecto a la monoterapia con benznidazol (75 mg/kg/día).

En conclusión, el tratamiento combinado de clofazimina o benidipina con benznidazol disminuyen la carga parasitaria en sangre y contribuyen a la reducción de la inflamación en el músculo estriado cuando se los administra en un modelo murino crónico de la enfermedad de Chagas. Se propone como perspectiva nuevos ensayos de combinación de fármacos que ayuden a disminuir la dosis y/o duración del tratamiento con benznidazol y nifurtimox.

Abstract

Chagas disease is a disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Current therapies for this disease are based on only two drugs: benznidazole and nifurtimox, both with several adverse effects and limited effectiveness in the chronic stage of the disease. Thus, there is a need in the development / search for new trypanocidal therapies.

In previous research, two drugs were selected, using *in silico* methodologies, as potential candidates for the treatment of Chagas' disease. Both were then assayed *in vitro* and *in vivo*, in acute and chronic murine models of this disease. Considering these results, the objective of this study is to study the combination of these compounds (clofazimine and benidipine) with benznidazole (reference drug) in a murine experimental model of chronic infection of Chagas' disease.

To carry out the work, C3H / HeN^k mice infected with **T. cruzi** strain K98, which is not lethal in the acute stage of the disease but produces skeletal and cardiac muscle damage at chronic infection, were used.

Animals were divided into five treatment groups: benznidazole (75mg / kg / day), benznidazole (30mg / kg / day), clofazimine (30mg / kg / day) and benznidazole 30mg / kg / day, with benidipine (15mg / kg / day) and benznidazole (30mg / kg / day) and animals without treatment (vehicle). Body weight evolution and overall condition of animals were recorded throughout the experiment. Electrocardiograms (ECG) were also performed at the end of 30-day treatment and prior to animals euthanasia. In addition, parasite load was determined in target tissues by real-time polymerase chain reaction (qPCR) technique, as well as histopathological studies of the striated muscles. Heart rate, length of the RR, QT and RP intervals as determined by ECG did not show significant differences between groups. However, the QRS interval showed aberrant morphology in all animals treated with benznidazole 75mg / kg / day. On the other hand, administration of these drugs in combination (clofazimine + benznidazol; benidipine + benznidazol) helps to reduce the parasite burden in some tissues, as well as a beneficial effect at the inflammatory level compared to benznidazole monotherapy (75 mg / kg / day).

In conclusion, the combined therapy of clofazimine or benidipine with benznidazole reduces parasitic load in peripheral blood and contributes to the decrease in striated muscle inflammation when administered in a chronic murine model of Chagas' disease. In

perspective, such new drug combination assays owing to decrease the dose and / or duration of benznidazole and nifurtimox treatment.

Índice

Introducción	8
Antecedentes	15
Hipótesis	17
Metodología	18
Resultados	23
Discusión	34
Bibliografía	40

Introducción

Según el Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación Argentina se calcula que alrededor de 10 millones de personas de América Latina se encuentran infectadas con *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), parásito causante de la enfermedad de Chagas. En nuestro país alrededor del 4 % de la población se estima que padece esta enfermedad. Las últimas estimaciones de casos (2015) indican que en Argentina habría 7.300.000 personas expuestas a dicha enfermedad y que, las provincias más afectadas dentro del territorio serian Chaco, Santiago del Estero, Catamarca, San Juan, Mendoza y Formosa (figura 1) (<http://www.msal.gob.ar/chagas/index.php/institucional/diagnostico>, último acceso 12/02/2017).

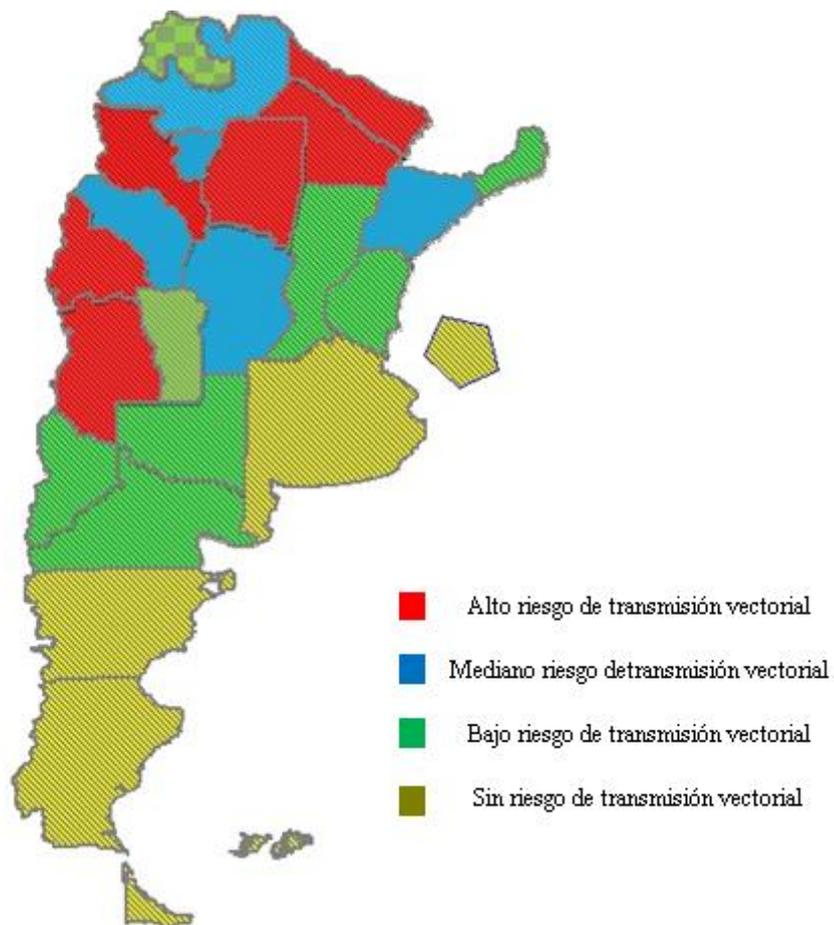


Figura 1: Mapa de riesgo de la enfermedad de Chagas en Argentina. Adquirida de <http://www.msal.gob.ar/chagas/>

La Organización Mundial de la Salud ubica la enfermedad de Chagas dentro de un grupo de enfermedades denominadas “enfermedades desatendidas” por parte de gobiernos e instituciones sanitarias. Este grupo de enfermedades suelen afectar especialmente a personas que viven en zonas marginales, con escasos recursos y con viviendas e infraestructura inadecuadas que favorecen la propagación de dichas enfermedades. Más aún afecta este panorama que las empresas farmacéuticas no consideran este entorno como favorable para la inversión en investigación y desarrollo de nuevas terapéuticas. Este es el motivo principal por el cual no se destinan suficientes recursos para el descubrimiento/búsqueda de nuevos y mejores fármacos. Dentro de este grupo heterogéneo de enfermedades, la mayoría de ellas parasitarias, encontramos a esquistosomiasis, filariasis linfática, tracoma causante de ceguera, oncocercosis, leishmaniasis, enfermedad del sueño, enfermedad de Chagas, entre otras.

La enfermedad de Chagas (también conocida como Tripanosomiasis Americana) es una enfermedad causada por el parásito protozoario *T. cruzi* y fue descubierta en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas. Millones de personas están expuestas a la enfermedad que se considera endémica principalmente en los países de América Latina y presenta diversas formas de transmisión (Fernandes Rodrigues, JC. *et al*, 2013).

La forma más frecuente de transmisión es mediante determinadas especies de insectos que mientras pican para alimentarse, defecan sobre la piel del huésped depositando los parásitos infectantes contenidos en las heces. Así, cuando el huésped se rasca facilita el ingreso de los parásitos al organismo. Estos insectos son hematófagos pertenecen a la subfamilia de los triatominos, siendo conocidos, en la mayoría de los países de América Latina, con el nombre de vinchuca (en otros como chinche, chichaguazu, entre otros) (Santamartino, M., 2009). Estos insectos presentan diferentes características morfológicas de acuerdo al estadio del desarrollo en que se encuentre el insecto, como se muestra en la figura 2.

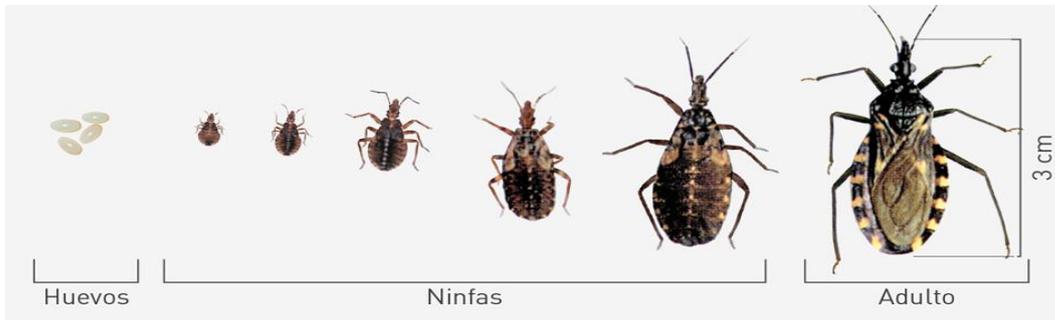


Figura 2: Ciclo de vida de la vinchuca. Adquirida de Gerardo Marti (CEPAVE, CONICET-UNLP, Argentina).

Además, existen otros mecanismos de transmisión de la enfermedad, como son: la vía congénita, es decir, de madre a hijo durante el embarazo; a través de trasplantes de órganos o transfusiones sanguíneas; la oral por ingesta de comida o bebida contaminada con parásito; los accidentes de laboratorio. Estos mecanismos son los responsables de nuevos casos en regiones del mundo donde no está presente el vector, pero habitan personas crónicamente infectadas (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>, último acceso 12/02/2017).

Ciclo de vida del parásito

El ciclo de vida del parásito *T. cruzi* comprende principalmente dos etapas. La primera de ellas es la que se da en el interior del insecto y la segunda etapa es la que se da cuando, por medio de una picadura o herida los parásitos ingresan en algún mamífero (ser humano, por ejemplo) (Diaz Lemos, JR., 2012).

Existen varios estadios biológicamente diferentes en *T. cruzi*. Dentro de ellos, los principales se denominan: amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes (figura 3). Los amastigotes corresponden al estadio intracelular en el hospedador infectado; los epimastigotes son la forma replicativa que se encuentra en el insecto vector; y los tripomastigotes se corresponden con la forma infectiva (y no replicativa) que puede ser encontrada en sangre, en el espacio intercelular de vertebrados y en la última etapa de diferenciación en el intestino del insecto vector (previo a la infección) (Diaz, ML y Gonzales, CI, 2014).

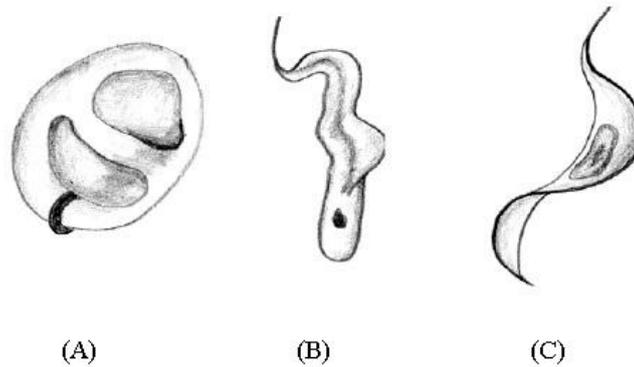


Figura 3: Formas celulares de *T. cruzi*: (A) Amastigote, (B) Epimastigote y (C) Tripomastigote.

En el intestino del insecto el parásito se encuentra en forma de epimastigotes, pero cuando estos pasan a la porción distal del mismo (ampolla rectal) se diferencian a la forma tripomastigote. Los tripomastigotes presentes en las heces de la vinchuca penetran en el nuevo huésped a través de la piel o mucosas. Una vez que el parásito ingresó en el mamífero, viaja por el torrente sanguíneo en forma de tripomastigote hasta lograr infectar alguna célula diana, de manera de diferenciarse a la forma amastigote, replicativa e intracelular. Al duplicarse, el parásito aumenta su número y luego de varias duplicaciones, los amastigotes comienzan a diferenciarse a tripomastigotes y posteriormente ocurre una lisis celular. Los tripomastigotes se liberan al medio donde invaden otras células o alcanzan el torrente sanguíneo para diseminarse por el organismo, buscando infectar nuevos tejidos (figura 4) (Zeledon, RA., 1996).

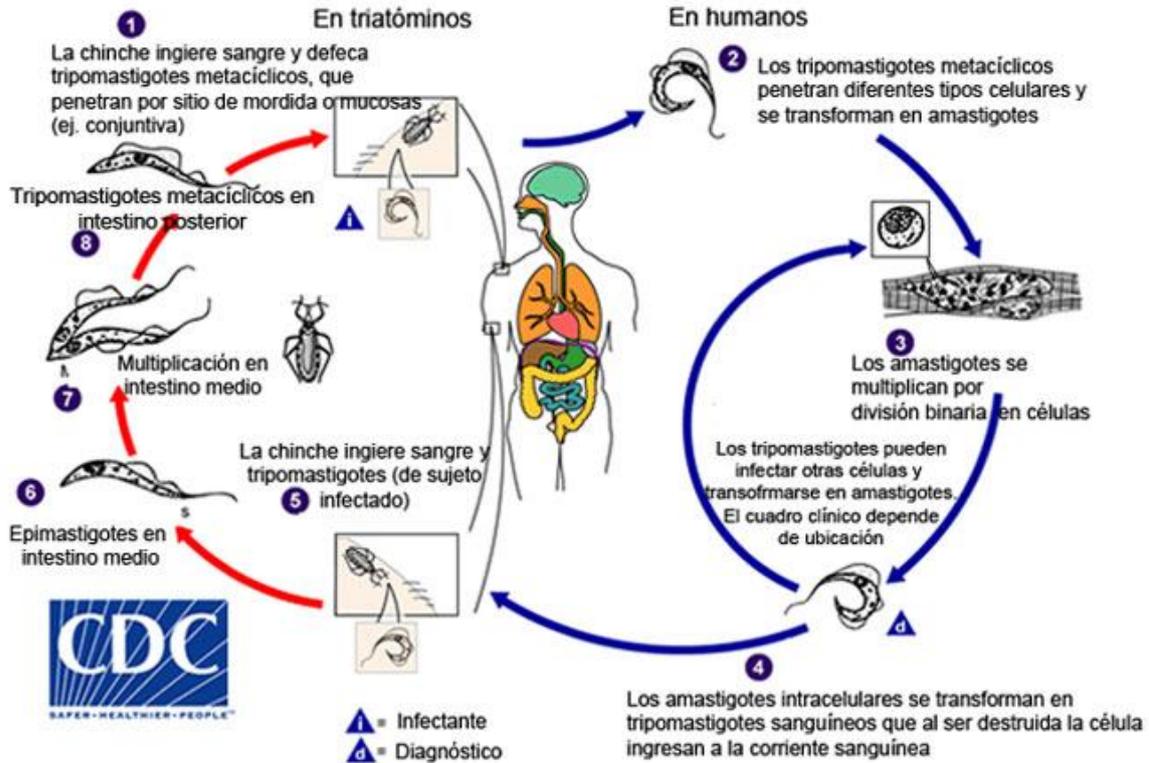


Figura 4: Ciclo de Vida del *Trypanosoma cruzi*. (Adquirida de Center for Disease Control and Prevention (CDC))

Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas se describe clínicamente en dos fases: aguda y crónica. La fase aguda de la enfermedad se caracteriza por la presencia de abundantes parásitos en el torrente sanguíneo, así como en tejidos del individuo infectado (Teixeira, ARL *et al*, 2006). La fase crónica está caracterizada por una reducción del número de tripomastigotes circulantes por la respuesta inmune. En esta fase la mayoría de los parásitos se encuentra en su forma intracelular en tejidos diana. En la fase crónica de la enfermedad la sintomatología puede o no estar presente. De hecho, la mayor parte de los pacientes en esta fase no muestra signos o síntomas de la enfermedad, a pesar de contar con la presencia del parásito en tejidos y en muy baja carga en circulación (Bustamante JM. *et al*, 2003). Alrededor de 20-40% de los pacientes que llegan a la etapa crónica de la enfermedad, presenta manifestaciones clínicas, las cuales comprenden alteraciones cardiológicas (arritmias crónicas, insuficiencias cardíacas,

atrofia, conocida como miocardiopatía chagásica crónica), neurológicas (ACV, alteraciones del sistema nervioso periférico) y problemas digestivos (megavisceras) (Borges, BC. *et al*, 2016). Algunos pacientes padecen lesiones cardíacas progresivas que pueden ser letales (Rassi, A Jr. *et al*, 2017)

En la actualidad, no hay vacuna preventiva contra la enfermedad de Chagas esto radica en las estrategias de evasión de la respuesta inmune y persistencia de los protozoos, que son eucariotas y por lo tanto más evolucionados que las bacterias y los virus, a los mecanismos patogénicos y las características epidemiológicas (Rodriguez Morales, O. *et al*, 2015).

Existen solo dos fármacos aprobados para tratar la enfermedad: el benznidazol y el nifurtimox (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, último acceso 30/01/2017). Ambos presentan importantes efectos adversos siendo causantes en muchos casos del abandono del tratamiento. Asimismo, se ha demostrado que estos compuestos no son efectivos en la fase tardía de la enfermedad (Paucar, R. *et al*, 2016), dejando entonces un grupo de pacientes sin tratamiento alguno en la fase crónica. Es por ello que existe la necesidad de encontrar nuevas moléculas que superen las limitaciones del benznidazol y nifurtimox.

Objetivo general

En el presente trabajo se buscó estudiar el efecto de nuevos agentes terapéuticos (benidipina y clofazimina) en combinación con benznidazol (droga de referencia) con el objetivo de disminuir los efectos adversos de la monoterapia con benznidazol para la enfermedad de Chagas.

Objetivos específicos

- Establecer un modelo murino de infección crónica de *T. cruzi* registrando, durante 180 días, el estado general de los animales, la evolución del peso, y el nivel de parásitos en sangre.
- Analizar la carga parasitaria mediante PCR en tiempo real (qPCR) en sangre y tejidos musculares estriados.
- Realizar un análisis histopatológico de marcadores inflamatorios y de daño muscular en el tejido muscular estriado.

El informe cuenta con una *introducción*, descrita anteriormente, donde se desarrolla la problemática de la enfermedad en Argentina, las características de la enfermedad, las posibles formas de contagio y el porqué de la necesidad de buscar alternativas terapéuticas. Una sección de *antecedentes*, donde se explica la necesidad de desarrollar nuevas terapias para esta enfermedad y se justifica el uso de la benidipina y clofazimina como fármacos alternativos. Posteriormente, una *hipótesis* que pone de manifiesto la intención de generar una nueva alternativa para el tratamiento de la enfermedad de Chagas; una sección de *metodología* que detalla los protocolos utilizados; una sección de *resultados*, donde se informan los datos obtenidos en el experimento, y finalmente la *discusión* y *conclusiones* del proyecto.

Antecedentes

Necesidad de alternativas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

En la actualidad, existen solo dos medicamentos aprobados para tratar la enfermedad de Chagas: el benznidazol y el nifurtimox. Ambos presentan limitaciones en el uso, especialmente debido a la aparición de reacciones adversas en el tratamiento que pueden llevar al abandono del mismo. Estos efectos pueden incluir desde dolor de cabeza, a trastornos gastrointestinales, hematológicos o neurológicos (Perez Molina, JA. *et al*, 2013).

El benznidazol se indica en dosis de 5-7 mg/kg/día por vía oral en dos tomas separadas, administradas durante 60 días. Los efectos adversos van desde náuseas, vómitos o erupciones cutáneas hasta leucopenia y agranulocitosis. Hay eventualidades en las cuales se debe suspender el tratamiento si las erupciones cutáneas son graves o si hay síntomas de polineuritis periférica (<http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/2.11.1.html>, último acceso 20/02/2017). El nifurtimox se indica en dosis de 8-10 mg/kg/día por vía oral en tres tomas separadas, administradas durante 90 días. Los efectos adversos van desde anorexia, náuseas, vómitos, dolor gástrico, insomnio, artralgias y convulsiones hasta una polineuritis periférica que es indicación para la suspensión el tratamiento (<http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/2.11.2.html>, último acceso 20/02/2017) (Forsyth, CJ. *et al*, 2016). Además, deber tenerse en cuenta que ni el benznidazol ni el nifurtimox pueden administrarse durante el embarazo o en personas con insuficiente hepática o renal. Por otra parte, durante el tratamiento, así como también en etapas posteriores, está indicada la realización de análisis de laboratorio para controlar los posibles efectos adversos y evolución del paciente (<http://www.infochagas.org/tratamiento>, último acceso 20/02/2017). Finalmente, es importante destacar que en la etapa crónica de la enfermedad la eficiencia terapéutica es limitada, y los efectos adversos nombrados anteriormente se acrecientan por la prolongación de tratamiento (Morillo, CA. *et al*, 2015). Por todo lo expuesto es indiscutible que es necesario ampliar las alternativas terapéuticas para solventar los inconvenientes de la medicación actual.

Recientemente, dos candidatos han sido seleccionados por modelos *in silico* y validados en modelos *in vitro* e *in vivo* (Bellera, CL. *et al*, 2015; Sbaraglini, ML. *et al*, 2016) como posibles terapias para el tratamiento de esta enfermedad. Los compuestos son: la

benidipina y la clofazimina (Figura 5). La benidipina es un agente bloqueador de canales de calcio que se utiliza actualmente para el tratamiento de la hipertensión (Umemoto, S. *et al*, 2016), y la clofazimina es un antibiótico indicado principalmente para el tratamiento de la lepra (<http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5513s/3.1.html>, último acceso 12/02/2017).

Ambos compuestos mostraron en estudios *in vitro*: disminución de la proliferación de epimastigotes, de la invasión celular y del número de amastigote. Asimismo, se ensayaron en un modelo de infección aguda encontrando reducción en la parasitemia (Bellera, CL. *et al*, 2015) y en un modelo de infección crónica una disminución de la inflamación y de la carga parasitaria en musculo estriado esquelético y en sangre en comparación con los ratones no tratados (Sbaraglini, ML. *et al*, 2016). Además, hubo una reducción en la extensión de los focos inflamatorios en los tejidos esqueléticos. Se postula que las terapias combinadas posibilitan la disminución de la dosis de los fármacos empleados en monoterapia llevando a una reducción de los efectos adversos. Es por ello que se propone que la combinación de estas moléculas con el benznidazol podría superar las limitaciones existentes en el tratamiento de la enfermedad.

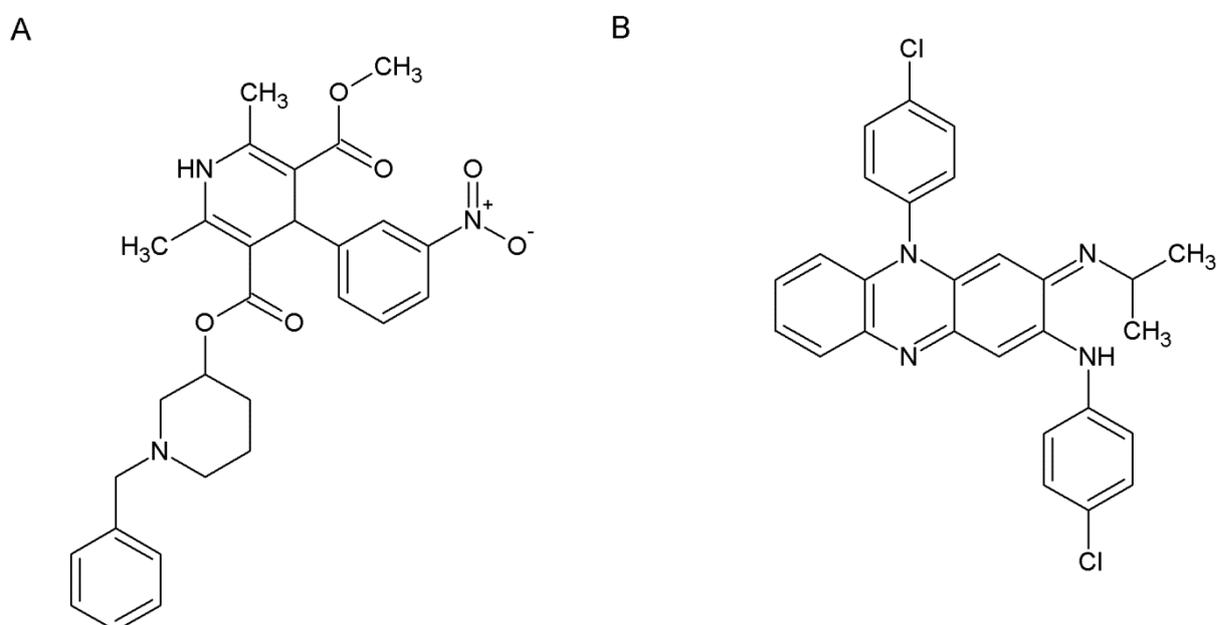


Figura 5: Estructura química de la benidipina (A) y la clofazimina (B).

Hipótesis

En este trabajo se estudió el efecto de la benidipina y la clofazimina en combinación con benznidazol, como posible alternativa terapéutica para la enfermedad de Chagas.

Se utilizó un modelo experimental murino de la etapa crónica de la enfermedad. Se combinaron los nuevos candidatos con la droga de referencia, esperando obtener una disminución de la carga parasitaria en sangre, así como también una reducción de la inflamación generada en los tejidos musculares que son más afectados por la infección con la cepa de *T. cruzi* utilizada en este modelo. A continuación, se describe el modelo animal y las metodologías utilizadas para determinar los parámetros inflamatorios.

Metodología

En el presente trabajo final se propone un modelo murino de infección crónica con *T. cruzi*.

Descripción del modelo animal: se utilizaron 20 ratones hembras de la cepa C3H/HeN^k. Todos los animales de experimentación fueron manejados de acuerdo con las normas del Instituto de Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Los procedimientos fueron aprobados por las regulaciones institucionales del Comité para el Cuidado de la Unidad de Laboratorio de la Universidad de Buenos Aires (Buenos Aires, Argentina). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de luz y oscuridad, con temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y con alimento y agua *ad libitum*.

Los ratones se infectaron con 1×10^5 células de la forma tripomastigotes (forma infectiva) de *T. cruzi*, cepa K98 (intraperitoneal), que es una cepa no letal en la etapa aguda de la enfermedad y tiene tropismo por tejido muscular. El día de la infección corresponde al día 0 (figura 6).

Durante todo el ensayo se registraron semanalmente los pesos y se realizaron observaciones de las jaulas a diario para controlar el estado en general de los animales. En nuestro modelo experimental, la etapa crónica inicia el día 90 post-infección, donde, no se observan parásitos en sangre en la observación al microscopio.

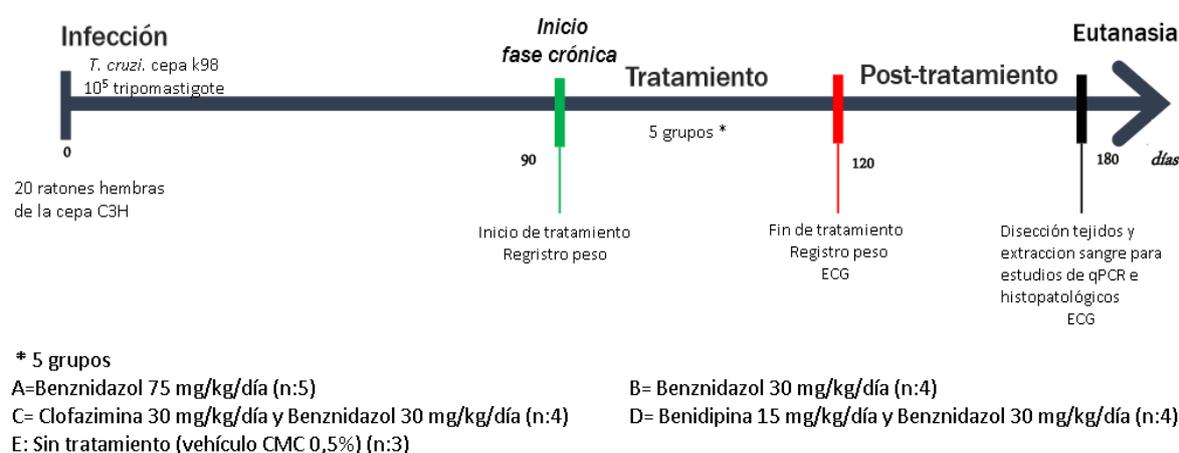


Figura 6: Diseño experimental

Los animales se dividieron en grupos de trabajo que fueron tratados vía oral (usando una sonda intraesofágica) durante 30 días consecutivos (con 1 día de descanso semanal). Los grupos de tratamiento fueron: benznidazol 75 mg/kg/día (n=5), benznidazol 30 mg/kg/día (n=4), clofazimina 30 mg/kg/día y benznidazol 30 mg/kg/día (n=4), benidipina 15 mg/kg/día y benznidazol 30 mg/kg/día (n=4) y sin tratamiento, a los cuales se les administró el vehículo, 0,5% carboximetilcelulosa (n=3). El clorhidrato de benidipina, la clofazimina y benznidazol se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La benidipina y el benznidazol se re-suspendieron en 0.5% de carboximetilcelulosa (SigmaAldrich) y clofazimina se re-suspendió en aceite de maíz.

A los cinco grupos se le asignaron referencias para el posterior análisis:

- **Grupo A:** animales tratados con benznidazol 75mg/kg/día,
- **Grupo B:** animales tratados con benznidazol 30mg/kg/día,
- **Grupo C:** animales tratados con clofazimina 30mg/kg/día y benznidazol 30mg/kg/día,
- **Grupo D:** animales tratados con benidipina 15mg/kg/día y benznidazol 30mg/kg/día,
- **Grupo E:** animales sin tratamiento (vehículo CMC 0,5%).

Estudios electrocardiográficos: Teniendo en cuenta que una de las principales complicaciones de esta enfermedad se relaciona con alteraciones en la conducción cardíaca, a los 120 días y 170 días post-infección se realizaron electrocardiogramas (ECG) a todos los grupos, incluyendo un grupo no infectado con *T. cruzi*. El estudio se realiza anestesiando a los animales con ketamina-xilazina (intraperitoneal) y colocando 4 electrodos subcutáneos en cada una de las extremidades. Estos estudios electrocardiográficos fueron realizados a través de una colaboración establecida con el Dr. Bruno Buchholz y la Lic. Jazmín Kelly en el Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA.

A los 180 días post- infección, los ratones fueron sacrificados para la obtención de muestras de sangre (por punción intracardíaca) y de tejidos para la posterior determinación de la carga parasitaria mediante la técnica de qPCR y el análisis por histopatología.

Determinación de la carga parasitaria: se purificó el ADN en muestras de sangre, músculo cardíaco y músculo esquelético, como se explica a continuación, para la determinación de la carga parasitaria mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Éstas se realizaron en el Instituto de Ciencia y Tecnología César Milstein (ICT Milstein), Fundación Pablo Cassará, gracias a la colaboración establecida con el grupo de la Dra. Carolina Carrillo.

Extracción de ADN: la extracción de ADN de sangre y de músculo se utilizó el kit comercial de QIAamp® DNA Mini (QIAGEN, Hilden, Alemania). Para las muestras de sangre se utilizó el kit comercial de purificación de ADN de sangre o fluidos corporales de QIAamp®. De acuerdo con las instrucciones del fabricante se emplearon 200µL de sangre, a los que se agregaron 20µL de proteínasa K y se incubó a 56°C durante 10 minutos. Se centrifugó, se añadió 200µL de etanol 96% a la muestra y se mezcló mediante vórtex de pulso durante 15 segundos. Se colocó en la columna de centrifugado QIAamp Mini y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se agregó 500 µl de solución buffer 1 del kit (AW1), se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min y se colocó en la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo de 2 ml y se desechó el filtrado. Se añadió 500µl de solución buffer 2 del kit (AW2) y se centrifugó a toda velocidad durante 3 minutos. Se colocó la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpio y se añadió 200 µL de buffer AE. Se incubó a temperatura ambiente 25 °C durante 1 minuto, y luego centrifugó nuevamente a 8000 rpm durante 1 min.

Para los tejidos musculares cardíaco y esquelético se utilizó el kit comercial de purificación de ADN a partir de tejidos de QIAamp®. De acuerdo con las instrucciones del fabricante se emplearon 25 mg de tejido (cortado en pequeños trozos) al cual se le añadió 20 µL de proteínasa K y se incubó a 56° C hasta que el tejido quedó completamente lisado. Se centrifugó y se añadió 4 µL de ARNasa A (100 mg/ml), se mezcló por vórtex pulsado durante 15 segundos y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 200 µL de la solución buffer AL a la muestra y se mezcló de nuevo por vórtex pulsado durante 15 segundos, y se incubó a 70°C durante 10 minutos. Se añadió 200 µL de etanol 96% a la muestra, y posteriormente, se mezcló y centrifugó brevemente. Se pasó a la columna, se centrifugó a 8000 rpm durante un minuto y luego de descartar el filtrado se agregó 500 µL la solución buffer 1 del kit (AW1). Se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto, se descartó el

filtrado, se añadió 500µl de la solución buffer 2 del kit (AW2) y se centrifugó nuevamente a máxima velocidad durante 3 min. Se colocó la columna de centrifugado QIAamp Mini en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpio y se añadió 200 µL de buffer AE. Se incubó a temperatura ambiente 25 °C durante 1 minuto, y luego centrifugó 8000 rpm durante 1 min.

Para la reacción de qPCR, se amplificó el gen SAT de *T. cruzi* y el gen de factor de necrosis tumoral (TNF α) específico murino como *housekeeping*. Las concentraciones de cada reactivo fueron empleadas para el gen Sat según lo sugerido por el fabricante de SybrGreen: 2 µL de ADN muestra, 19.8 µL de primer forward y primer reverse, 330 µL de solución buffer (5µL) y 158.4µL de agua miliQ por placa de análisis. La amplificación se realizó en un termociclador (StepOne Real-Time PCR Systems from Thermo Scientific) utilizando 40 ciclos, de 10 min a 95°C, 15 min a 95°C, 1 min a 60°C, 15 seg 95°C, 15 seg 60°C y 15 min a 95°C.

En cada placa se corrieron los controles necesarios y los ensayos por triplicado. Para el caso de tejido sanguíneo, se realizó una curva de calibración (Ct en función de número de parásitos). Posteriormente, los valores de Ct obtenidos de las distintas condiciones se extrapolaron de la curva, obteniendo así la carga parasitaria en sangre a los 180 días post infección. Para el caso de los tejidos musculares, se utilizó el método de $\Delta\Delta C_t$ para la cuantificación relativa. Los datos se expresaron como veces de decrecimiento ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) en función del tratamiento con respecto al grupo control.

Análisis histopatológico: se realizó el análisis histopatológico de músculo cardíaco y esquelético utilizando cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. De cada animal se realizaron 3 preparados. Se obtuvieron 4 imágenes de cada preparado de manera de abarcar toda la superficie de órgano. Las imágenes se obtuvieron a través de una cámara (Nikon ECLIPSE E600 - Nikon Corp., Tokyo, Japan), conectada a un microscopio (Nikon) y procesados por el software analizador de imágenes Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Se determinó para cada caso: inflamación focal, inflamación difusa y reemplazo adiposo. A continuación, se detallan los parámetros cuantificados: el proceso de cuantificación:

- Reemplazo adiposo: Se utilizaron 4 fotos de cada corte 100x y la determinación de este parámetro fue semi-cuantitativa utilizando un score que representa la presencia de adipocitos asociados al tejido muscular. El criterio se basó en un sistema

de signos +, donde “+” indica presencia entre 1-3 adipocitos (poco abundante), “++” indica presencia entre 4-8 adipocitos (abundante), “+++” revela entre 9 a 19 (muy abundante y “++++” para 20 o más adipocitos por foto.

- Inflamación difusa: Se utilizaron 4 fotos de cada corte 100x y se cuantificó 3 cuadrados de 30000 um^2 , contando la cantidad de núcleos de cada imagen. Posteriormente se realizó un promedio del número de núcleos por foto, y finalmente en función al tratamiento.

- Inflamación focal: Se utilizaron 4 fotos de cada corte 100x, midiendo el área ocupada por los infiltrados focales que se encuentran alrededor de un vaso sanguíneo. De todas las áreas por foto, se realiza un promedio de las áreas máximas por ratón y posteriormente en función al tratamiento.

Análisis estadístico: Los resultados fueron expresados como media o mediana \pm desvío estándar (DS) o error estándar de la media (EE). Para las comparaciones entre múltiples grupos se empleó el test de Análisis de Varianza (ANOVA) seguido del post- test de Bonferroni para determinar las diferencias significativas ($p < 0.01$). Todos los valores fueron obtenidos utilizando los programas GraphPad Prism® 5.01 y Microsoft Excel.

Resultados

Como hemos comentado previamente, la cepa K98 de *T. cruzi* tiene tropismo por el tejido muscular y posee virulencia moderada. Esta característica permite el desarrollo de un modelo animal crónico con la idea de modelar la etapa crónica de la enfermedad de Chagas.

Previo al inicio del tratamiento se determinó el número de parásitos circulantes registrado por microscopía convencional en la fase aguda de la infección (figura 7). A partir del día 85 dpi se dejaron de detectar parásitos circulantes mediante esta técnica, debido a que la respuesta inmune disminuyó el número de parásitos en sangre periférica por debajo del umbral de detección por microscopia convencional. Complementariamente, se observaron diariamente las jaulas de los animales durante todo el experimento sin encontrar ninguna alteración en el comportamiento de los ratones durante ese período.

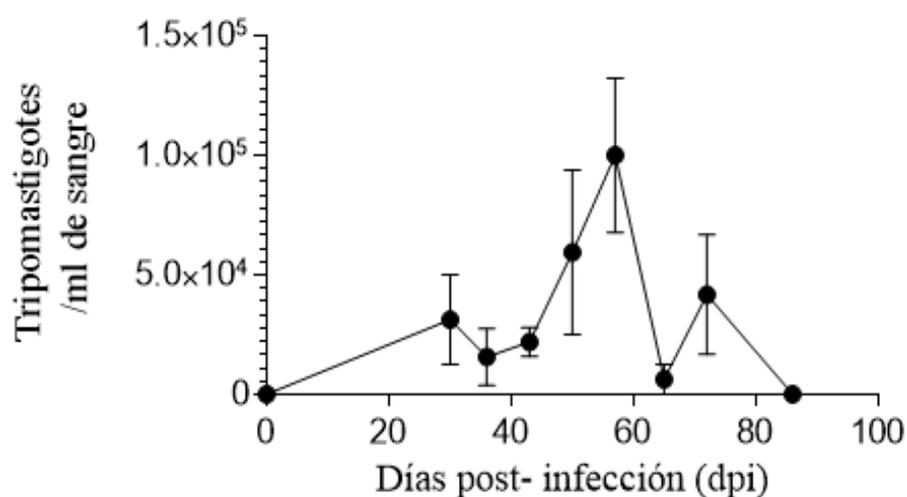


Figura 7: Evolución de la parasitemia promedio de los animales pre- tratamiento

Evolución del peso pre y post tratamiento

Asimismo, se registró la evolución del peso de cada animal, encontrando que durante el tratamiento (90-120 días post-infección) el total de los animales mostraba un descenso en el peso. Es posible, que esto se relacione con el estrés causado por la manipulación diaria y el uso de una sonda esofágica para la administración de los compuestos. Sin embargo, a partir del día 150 post-infección el grupo que mostró un descenso marcado de su peso corporal fue el grupo A, tratado con la mayor dosis de benznidazol (figura 8).

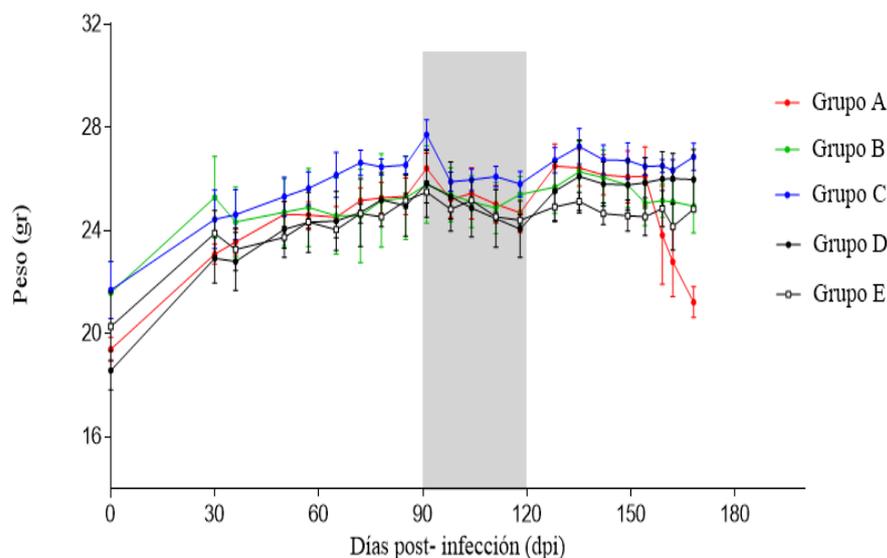


Figura 8: Variación del peso corporal (gramos) en función del tiempo. **Grupo A:** Animales tratados con benznidazol 75 mg/kg/día, **Grupo B:** Animales tratados con benznidazol 30 mg/kg/día, **Grupo C:** Animales tratados con clofazimina y benznidazol, **Grupo D:** Animales tratados con benidipina y benznidazol, **Grupo E:** Animales sin tratamiento (Vehículo CMC 0,5%).

Efecto de los tratamientos en etapa crónica sobre los registros electrocardiográficos

La enfermedad de Chagas se caracteriza por presentar a largo plazo afecciones importantes en el corazón, denominada miocardiopatía chagásica crónica (Rossi, MA., 2001). En esta afección se observa una inflamación del músculo cardíaco a consecuencia de la infección crónica con *T. cruzi* y es la principal causa de mortalidad de los pacientes con Chagas (Ramos, SG., 1995). Una de las características más importantes de esta cardiomiopatía es la pérdida progresiva de la capacidad contráctil, que provoca trastornos del ritmo de los latidos por alteraciones en la conducción cardíaca (Higuchi, ML. *et al*, 2003).

Es por ello que el estudio electrocardiográfico (ECG) en el modelo planteado resulta pertinente para evaluar si alguno de los fármacos ensayados mejora de alguna manera la función cardíaca. Se determinó la frecuencia cardíaca (FC) y los siguientes intervalos: RR, PR y QT. Los ECG se realizaron post- tratamiento (120dpi) y al finalizar el experimento (170 dpi).

En ambos tiempos no se registraron diferencias en la FC y en la duración de los intervalos RR, PR y QT. Sin embargo, el intervalo QRS se modificó entre las dos determinaciones (figura 9). Los animales tratados con la mayor concentración de benznidazol (grupo A) no mostraron alteración a los 120 días post-infección (dpi), sin embargo, al finalizar el experimento todos evidenciaron una alteración en la morfología del intervalo QRS. Además, tanto el grupo D como el E presentaron alteraciones en este intervalo post tratamiento que no se revirtieron a los 170dpi (Tabla I).

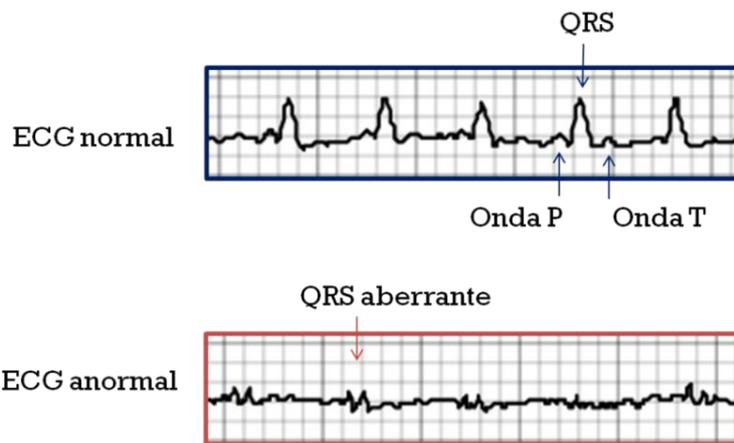


Figura 9: Esquema de un electrocardiograma (ECG) normal y de un ECG con intervalo QRS aberrante.

Tabla I: Alteraciones de la morfología del intervalo QRS en los 5 grupos experimentales a los 120 y 170 días post infección.

Intervalo QRS aberrante			
120 días post infección		170 días post infección	
Grupo A	0%	Grupo A	80%
Grupo B	0%	Grupo B	0%
Grupo C	0%	Grupo C	0%
Grupo D	50%	Grupo D	50%
Grupo E	25%	Grupo E	25%

Grupo A: Animales tratados con benznidazol 75 mg/kg/día, **Grupo B:** Animales tratados con benznidazol 30 mg/kg/día, **Grupo C:** Animales tratados con clofazimina y benznidazol, **Grupo D:** Animales tratados con benidipina y benznidazol, **Grupo E:** Animales sin tratamiento (vehículo CMC 0,5%).

Determinación de la carga parasitaria en sangre, corazón y cuádriceps por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

A partir de la extracción de ADN realizada en las muestras de sangre se procedió a la cuantificación de los equivalentes de parásito en los tejidos más comprometidos por la infección de *T. cruzi* (sangre y musculo estriado cardiaco y esquelético).

Al analizar las muestras de sangre de los ratones infectados encontramos que todos los tratamientos ensayados mostraron una reducción significativa de los equivalentes de parásito por mililitro de sangre ($p < 0.001$). Más aún, el grupo C, que recibió la terapéutica combinada clofazimina y benznidazol, evidenció una mayor reducción de la carga parasitaria en sangre, respecto al tratamiento del grupo B, que recibió benznidazol únicamente (figura 10).

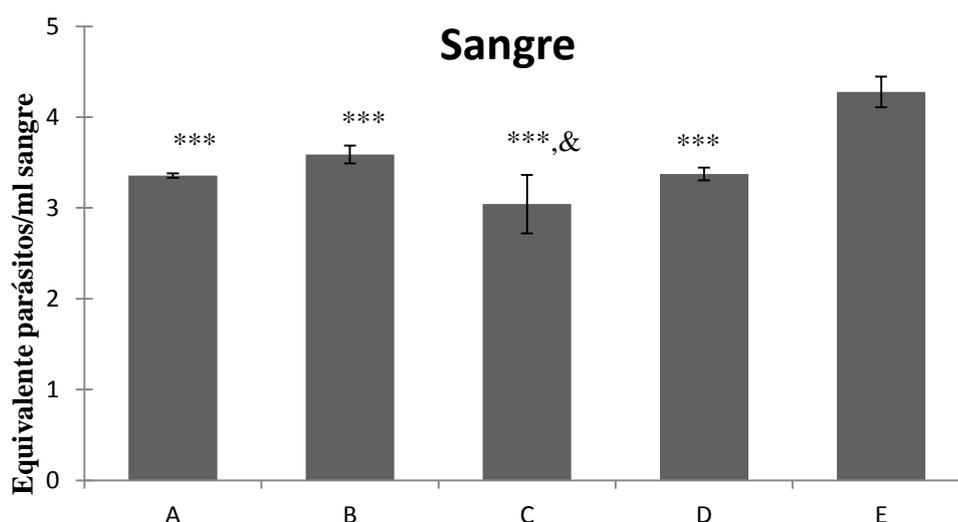


Figura 10: Determinación de la carga parasitaria mediante qPCR de sangre en los cinco grupos experimentales. **Grupo A:** Animales tratados con benznidazol 75 mg/kg/día, **Grupo B:** Animales tratados con benznidazol 30 mg/kg/día, **Grupo C:** Animales tratados con clofazimina y benznidazol, **Grupo D:** Animales tratados con benidipina y benznidazol, **Grupo E:** Animales sin tratamiento (vehículo CMC 0,5%). Para las comparaciones entre múltiples grupos se empleó el test de análisis de varianza (ANOVA) seguido del post-test de Bonferroni para determinar las diferencias significativas. *** $p < 0.001$ vs. Grupo E, & $p < 0.01$ vs. Grupo B.

Igualmente, evaluamos la carga parasitaria en músculo estriado esquelético (cuádriceps) y cardíaco (corazón), ambos tejidos blanco de daño por este parásito, como hemos explicado anteriormente. Para el análisis de los resultados se utilizó el método de $\Delta\Delta C_t$, y los datos fueron expresados como “veces de disminución ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)” en función del tratamiento. En el caso de los cuádriceps, los tratamientos mostraron una tendencia a la disminución de la cantidad de parásito en este tejido. Sin embargo, la dispersión de los valores obtenidos no permitió que las diferencias fueran estadísticamente significativamente, como se observa en la figura 11.

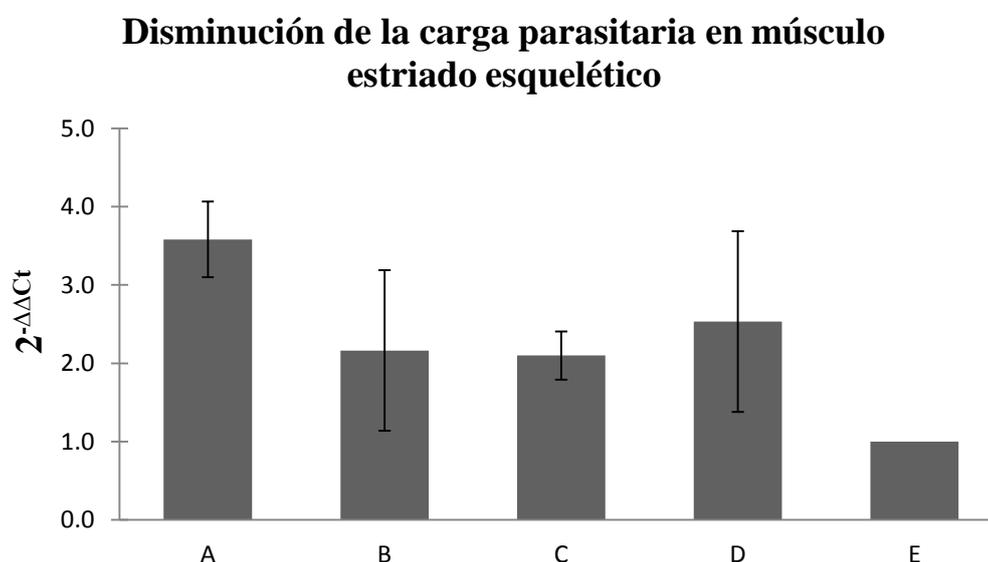


Figura 11: Determinación de la carga parasitaria mediante qPCR del tejido muscular estriado esquelético en los cinco grupos experimentales. **Grupo A:** Animales tratados con benznidazol 75 mg/kg/día, **Grupo B:** Animales tratados con benznidazol 30 mg/kg/día, **Grupo C:** Animales tratados con clofazimina y benznidazol, **Grupo D:** Animales tratados con benidipina y benznidazol, **Grupo E:** Animales sin tratamiento (vehículo CMC 0,5%). Para las comparaciones entre múltiples grupos se empleó el test de Análisis de Varianza (ANOVA) seguido del post-test de Bonferroni para determinar las diferencias significativas.

Para el caso de las muestras de tejido cardíaco, también se observó una tendencia a la disminución de la carga parasitaria con la mayoría de los tratamientos (grupos A, B y C), siendo el grupo A el que produjo la mayor reducción (figura 12). El grupo de animales del

grupo D no evidenció ninguna diferencia respecto al grupo sin tratamiento. A pesar de ello, los resultados no fueron significativos frente al test estadístico utilizado.

Disminución de la carga parasitaria en músculo estriado cardíaco

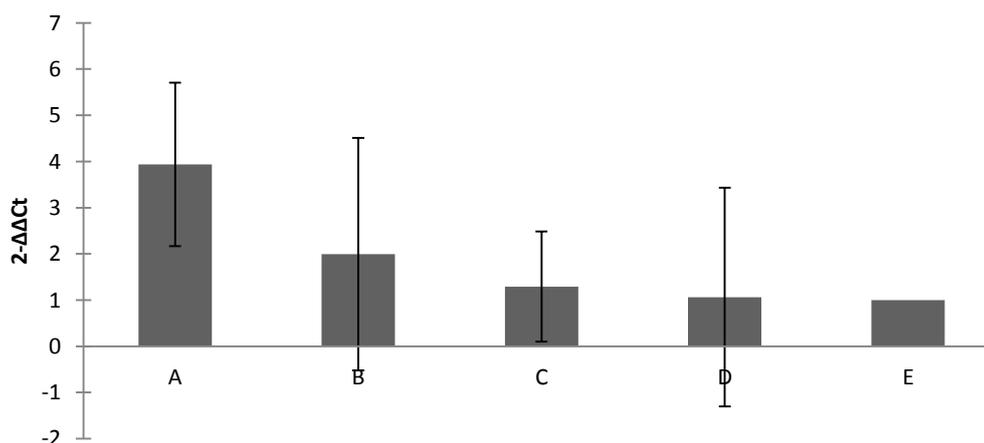


Figura 12: Determinación de la carga parasitaria mediante qPCR del tejido muscular estriado cardíaco en los cinco grupos experimentales. **Grupo A:** Animales tratados con benznidazol 75 mg/kg/día, **Grupo B:** Animales tratados con benznidazol 30 mg/kg/día, **Grupo C:** Animales tratados con clofazimina y benznidazol, **Grupo D:** Animales tratados con benidipina y benznidazol, **Grupo E:** Animales sin tratamiento (vehículo CMC 0,5%). Para las comparaciones entre múltiples grupos se empleó el test de Análisis de Varianza (ANOVA) seguido del post-test de Bonferroni para determinar las diferencias significativas.

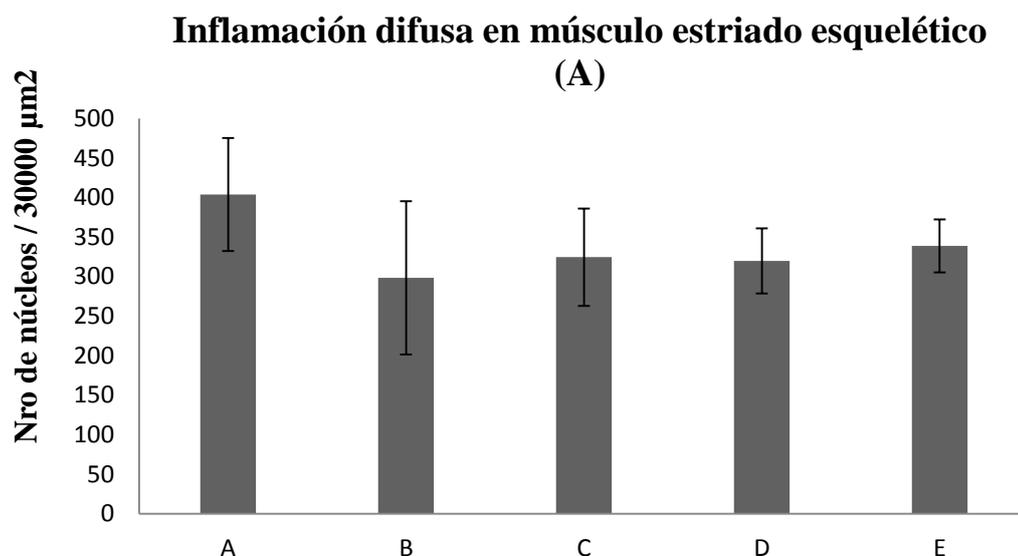
Efecto del tratamiento en etapa crónica sobre la histología de tejidos blanco de daño

Complementariamente al estudio por qPCR, se realizaron cortes histológicos de músculo esquelético y cardíaco para el análisis histopatológico. Se determinaron parámetros relacionados con la inflamación y el daño tisular, de manera de evaluar si la combinación de fármacos podría mejorar la destrucción del tejido causada por la inflamación. A continuación, describimos los resultados de cada uno de los parámetros estudiados:

- Infiltrados inflamatorios

Un parámetro de importancia en la evaluación del daño tisular es la infiltración de células inflamatorias en el tejido. Determinamos entonces, la inflamación difusa como el número de núcleos presentes por área en cortes de corazón y cuádriceps tenidos con hematoxilina-eosina.

En el tejido esquelético (figura 13A) no se encontraron diferencias significativas en la inflamación difusa en este tipo de tejido, pero se evidenció que el grupo A era el que presentaba mayor daño muscular y en el tejido cardíaco (figura 13B) todos los tratamientos disminuyeron la inflamación difusa de manera significativa respecto al grupo control (grupo E) ($p < 0.001$).



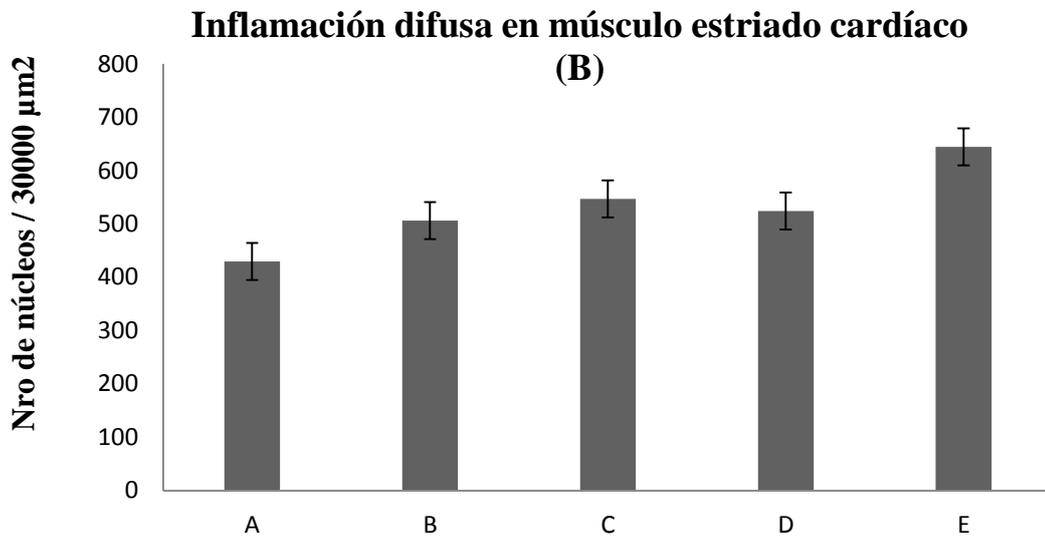


Figura 13: Inflamación difusa en tejido muscular estriado esquelético (A) y cardíaco (B) en los cinco grupos experimentales. (**Grupo A:** Animales tratados con benznidazol 75 mg/kg/día, **Grupo B:** Animales tratados con benznidazol 30 mg/kg/día, **Grupo C:** Animales tratados con clofazimina y benznidazol, **Grupo D:** Animales tratados con benidipina y benznidazol, **Grupo E:** Animales sin tratamiento (vehículo CMC 0,5%)) * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. Grupo E

Adicionalmente, se determinaron las áreas ocupadas por infiltrados inflamatorios focales, como se muestra en la figura 14. Principalmente, estos infiltrados se encuentran alrededor de los vasos sanguíneos que irrigan al órgano. Se evaluó la extensión de estos infiltrados encontrando que en corazón todos los tratamientos mostraron menor área de infiltrado focal respecto al control (grupo E), siendo el grupo D el que evidenció la mayor disminución (figura 14A). En el músculo esquelético se observó que el grupo C mostró mayor área de infiltrado, sin embargo, el grupo D y el grupo B fueron los que lograron disminuir este parámetro (figura 14B).

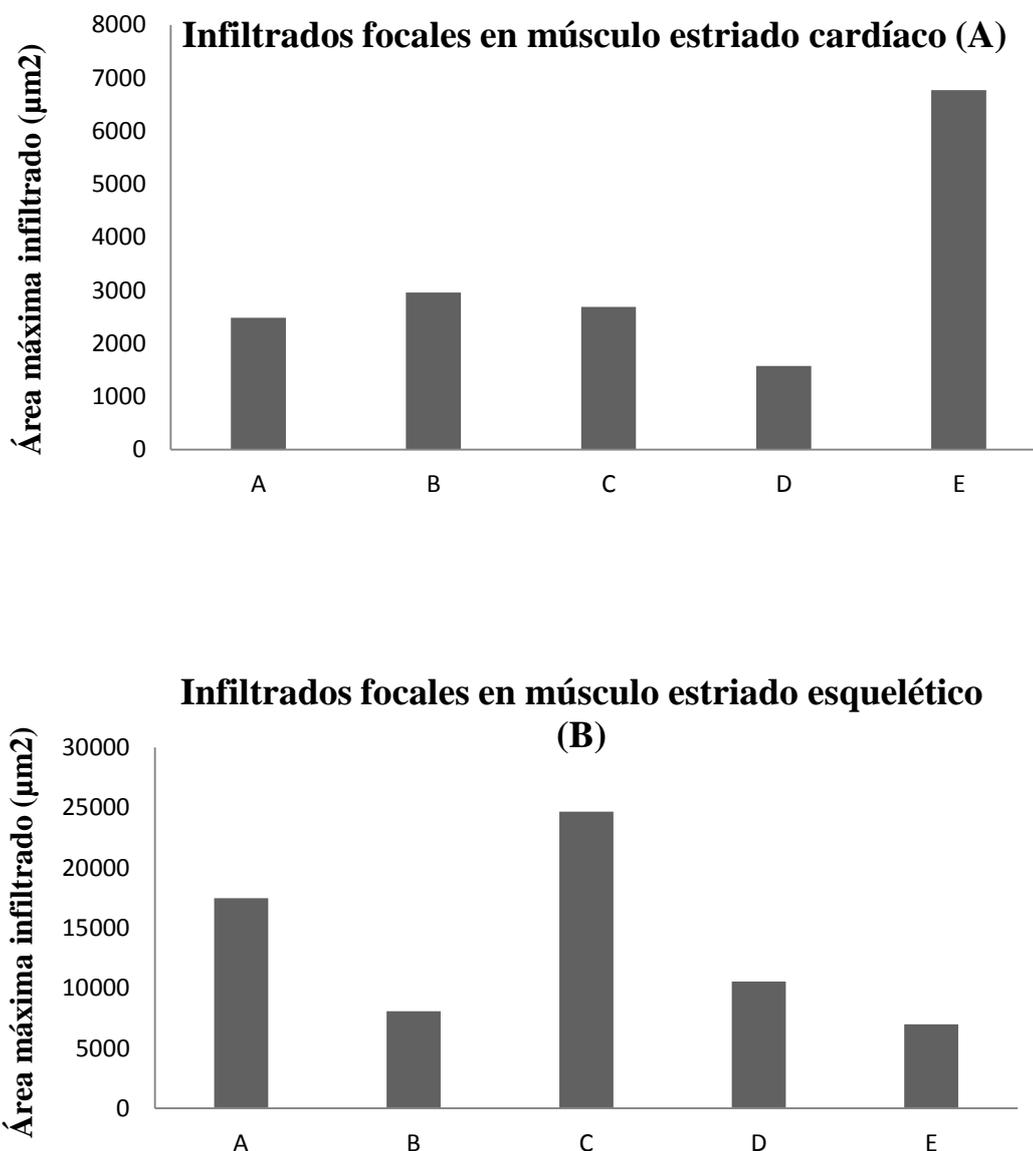


Figura 14: Inflamación focal en tejido muscular estriado cardíaco(A) y esquelético (B) en los cinco grupos experimentales. (**Grupo A:** Animales tratados con benznidazol 75 mg/kg/día, **Grupo B:** Animales tratados con benznidazol 30 mg/kg/día, **Grupo C:** Animales tratados con clofazimina y benznidazol, **Grupo D:** Animales tratados con benidipina y benznidazol, **Grupo E:** Animales sin tratamiento (vehículo CMC 0,5%).

- Reemplazo adiposo

La inflamación excesiva del tejido adiposo se ve favorecida en enfermedades crónicas y se ve asociado a enfermedades que conllevan a problemas cardíacos y en las visceras (Ghigliotti, G. *et al*, 2014). La miocarditis crónica es un proceso que lleva al daño irreversible y alteraciones histológicas de la fibra muscular cardíaca. Estas células que no se regenera o multiplica, son reemplazadas por tejido fibrótico o tejido adiposo. Este proceso se conoce como reemplazo adiposo y es frecuentemente observado en modelos experimentales y en pacientes con cardiopatía crónica por enfermedad de Chagas (Caliari, MV. *et al*, 2002).

Este parámetro fue analizado semi-cuantitativamente mediante el estudio de cortes histológicos de muestras de cuádriceps (tejido muscular esquelético) teñidas con hematoxilina-eosina. Al analizar las imágenes se registraron pocos adipocitos para los tratamientos combinados propuestos (grupo C y grupo D), indicando que el reemplazo adiposo en estas condiciones es escaso. En el caso de los grupos tratados con la monoterapia de benznidazol en sus dos concentraciones, se evidenció una relativamente mayor cantidad de adipocitos. Previsiblemente, el grupo sin tratamiento presentó un daño muscular elevado evidenciado por un gran número de adipocitos entre las fibras musculares (Tabla II) (figura 15).

Tabla II: Reemplazo adiposo en cuádriceps de los cinco grupos experimentales.

Adipocitos		Criterio por foto	
Grupo A	++	+	1-3 adipocitos / poco abundante
Grupo B	++	++	4-8 adipocitos / abundante
Grupo C	+	+++	9-19 adipocitos / muy abundante
Grupo D	+	++++	más de 20 adipocitos
Grupo E	+++		

A: Animales tratados con benznidazol 75 mg/kg/día, **Grupo B:** Animales tratados con benznidazol 30 mg/kg/día, **Grupo C:** Animales tratados con clofazimina y benznidazol, **Grupo D:** Animales tratados con benidipina y benznidazol, **Grupo E:** Animales sin tratamiento (vehículo CMC 0,5%).

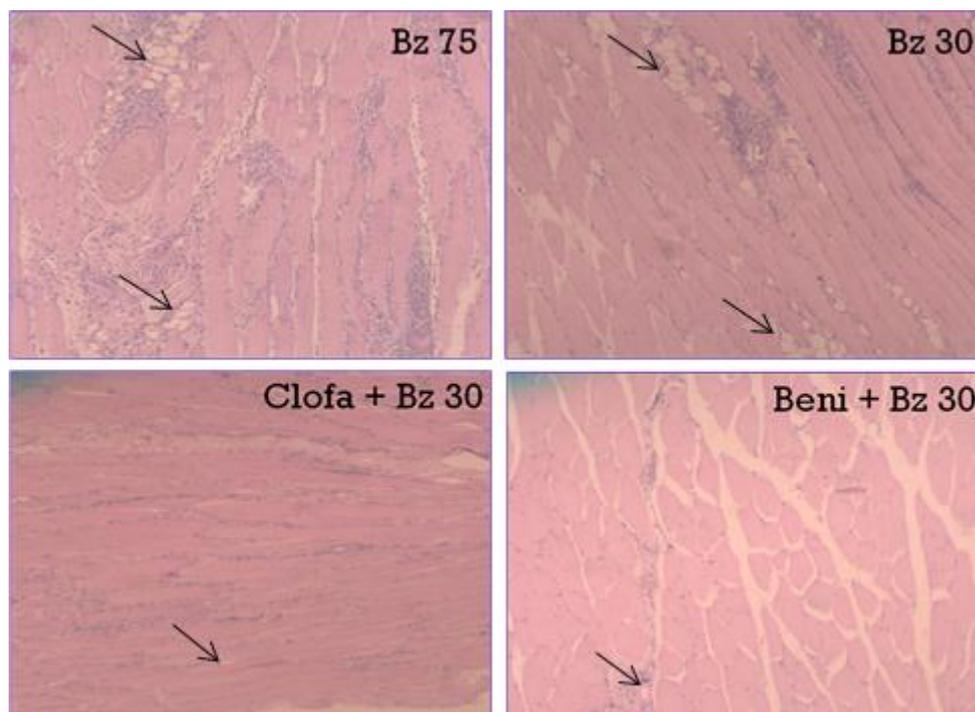


Figura 15: Reemplazo adiposo en el músculo esquelético en los cuatro tratamientos experimentales. **Grupo A:** Animales tratados con benznidazol 75 mg/kg/día, **Grupo B:** Animales tratados con benznidazol 30 mg/kg/día, **Grupo C:** Animales tratados con clofazimina y benznidazol, **Grupo D:** Animales tratados con benidipina y benznidazol.

Discusión

En este trabajo se estudió el efecto terapéutico de la acción combinada de la benidipina y la clofazimina con el benznidazol en un modelo animal de la enfermedad de Chagas. El proyecto se basó en la infección de ratones de la cepa C3H/HeN^k con una cepa de *T. cruzi* (K98) de moderada virulencia que permitió que se desarrolle la etapa crónica de la enfermedad.

En los últimos años se avanzó sobre las características biológicas de *T. cruzi* así como en la búsqueda de nuevos tratamientos. Sin embargo, a la fecha no hemos conseguido un tratamiento con acción antiparasitaria que actué de manera eficiente tanto en las formas intracelulares (amastigote), como en las extracelular (epimastigote y tripomastigote) evitando las complicaciones que posee el tratamiento de referencia para esta enfermedad (Pérez-Molina, JA. *et al*, 2013). Es por eso, que se decidió ensayar la acción combinada de dos fármacos: la clofazimina y de la benidipina con el benznidazol (fármaco de elección), a fin de reducir las limitaciones del tratamiento convencional y sus efectos adversos cuando se usa en monoterapia (Bermudez, J. *et al*, 2015).

La clofazimina es el fármaco utilizado para el tratamiento de la enfermedad de la lepra, pues posee actividad antimicrobiana y antiinflamatoria (Cholo, MC. *et al*, 2012) y la benidipina es un bloqueador de canales de calcio con efecto antihipertensivo y cardioprotector (Yao, K. *et al*, 2006). Mediante la administración combinada de estos fármacos de manera conjunta con benznidazol se pretende alcanzar la reducción de la carga parasitaria y de los efectos de la infección crónica sobre órganos blancos en la enfermedad de Chagas.

Dado que *T. cruzi* tiene una alta afinidad por el tejido muscular cardíaco, y que una de las consecuencias de la enfermedad es la cardiopatía chagásica (como se discutió previamente), evaluamos en dos instancias, la evolución de la función cardíaca de los animales infectados y tratados mediante ECG. Los ECG permiten registrar la actividad eléctrica del corazón para así poder detectar alteraciones en la conducción cardíaca propias de la miocardiopatía chagásica crónica en las cuales el corazón se ve sometido a arritmias y disfunción contráctil (Vilar-Pereira, G. *et al*, 2016). De manera notable, observamos alteraciones en la morfología onda QRS en 4/5 ratones tratados con benznidazol 75mg/kg/día a los 170 dpi (50 días post fin del tratamiento) no así a los 130 dpi y tampoco con menores dosis (30 mg/kg/día). Si bien este fármaco es reconocido por presentar efectos adversos

dermatológicos, neurológicos, hematológicos y gastrointestinales (Viotti, R. *et al*, 2009), efectos secundarios cardiológicos solo se reportaron en un trabajo pionero en el cual 20% de los pacientes tratados presentaban taquicardia (Levi, GC. *et al*, 1975). Tiene sentido destacar que el uso de menores dosis de benznidazol e incluso la combinación del mismo con clofazimina previene completamente la aparición de los intervalos QRS aberrantes. Además, teniendo en cuenta el efecto antiinflamatorio de la clofazimina, es posible que dicha actividad contribuya a disminuir la miocarditis característica de la infección por este parásito. En contraste, el uso de benidipina (un fármaco con efecto cardioprotector) no previno completamente esta afección en los ECG (Tabla I).

Por otra parte, el parásito se aloja preferencialmente en tejidos particulares del organismo, donde provoca daño que afectan al normal funcionamiento del órgano en cuestión. Dentro de estos tejidos blancos de daño, encontramos a los músculos estriado y esquelético. A su vez, el tejido adiposo que parece actuar como importante reservorio de este parásito (Lewis, MD. *et al*, 2014). Teniendo en cuenta el tropismo a músculo estriado de este aislamiento de *T. cruzi*, (Lewis, MD. *et al*, 2014) se decidió estudiar la carga parasitaria en músculos estriados (cardíaco y esquelético) y en sangre, mediante la técnica de qPCR. Mediante las distintas técnicas utilizadas, queda en evidencia que, al final del experimento, se sigue detectando genoma de *T. cruzi*, por lo que se llega a la conclusión que no se logra eliminar completamente la infección. Sin embargo, se logra una reducción de la concentración de parásitos en sangre. Al evaluar la carga parasitaria en los músculos estriados, este efecto parasiticida no fue tan evidente. En efecto, para el caso del corazón, se observó una tendencia a la reducción de los niveles de ADN del parásito, pero en el músculo estriado esquelético la gran dispersión de los datos no permitió concluir acerca de este parámetro. Sería interesante repetir los experimentos aumentando el número de animales y así disminuir la variabilidad de estos resultados. Por otra parte, es importante tener en cuenta que en infecciones crónicas donde la mayor carga parasitaria se encuentra en el estadio intracelular en órganos macizos, como el caso de *T. cruzi*, la biodisponibilidad del fármaco hacía los tejidos que son reservorio, y a su vez dentro de la célula juega un rol más importante que su disponibilidad plasmática. La conjunción de ambos resultados indica que los tratamientos combinados, que emplean menores dosis de benznidazol, dan resultados similares a los de la monoterapia. Su ventaja sería la reducción de los efectos adversos al utilizar menores dosis de fármaco (Coronel, MV. *et al*, 2017).

Complementariamente, al evaluar la inflamación difusa y focal de los tejidos, encontramos que los tratamientos combinados contribuyen a disminuir el daño tisular causado por la inflamación. En el tejido muscular estriado cardíaco se observó una disminución del número de núcleos por área de tejido en todos los grupos experimentales tratados respecto al grupo control, sin embargo, esto no se evidenció al analizar el músculo estriado esquelético. Por otra parte, al determinar la inflamación focal del tejido esquelético se observó que los animales tratados con la acción combinada de clofazimina con benznidazol aumentaron considerablemente el número de área de infiltrados, es decir fueron los que lograron una disminución en la inflamación del tejido. Estos parámetros resultan útiles de analizar para evaluar la eficacia del tratamiento en la supresión de parásitos, como la reducción de las lesiones en el modelo animal. En ciertos trabajos se evidencia que a pesar de no hallarse parásitos en cortes histológicos en el corazón, se evidencia miocarditis crónica y fibrosis cardiaca, características claras de la enfermedad de Chagas crónica (Lewis, MD. *et al*, 2014). En este trabajo, evidenciamos por qPCR la presencia de parásitos en sangre y en tejido cardíaco.

Al evaluar la inflamación muscular ocasionada por el parásito, el grupo tratado con clofazimina y benznidazol así como el tratado con benidipina y benznidazol mostraron una disminución en el tejido dañado, evidenciado por menor reemplazo adiposo, en comparación con el tratamiento estándar de benznidazol. Otros trabajos pudieron demostrar una acción sinérgica más notoria mediante la administración de clomipramina junto con una dosis reducida de benznidazol evidenciando una disminución de la inflamación y el daño en el músculo cardíaco (García, MC. *et al*, 2016). Nuestros resultados no permiten descartar que la administración conjunta de benznidazol en baja dosis y benidipina o clofazimina produce el efecto sinérgico por nosotros esperado. Sería importante realizar nuevos estudios farmacocinéticos para poder explicar la ausencia de sinergismo en fármacos que por separado mostraban tener un efecto tripanocidas en fase crónica (Sbaraglini, ML. *et al*, 2016).

La reducción de la dosis de benznidazol parece disminuir el efecto tripanocida de esta droga en tejidos musculares con la mayor concentración del fármaco de referencia (benznidazol 75 mg/kg/día). En contraposición, a estos resultados un trabajo reciente plantean que una dosis más baja de benznidazol que la recomendada ejerce un efecto antiinflamatorio y antiparasitario relevante (Cevey, AC. *et al*, 2017). En efecto, en la actualidad existen estudios farmacocinéticos en humanos que arrojan resultados contradictorios acerca de si la dosis

recomendada de benznidazol se puede disminuir sin alterar su capacidad tripanocida (Fernández, ML. *et al*, 2016).

En resumen, los resultados obtenidos soportan, parcialmente, la hipótesis planteada de que la benidipina y la clofazimina podrían ser una alternativa terapéutica para la enfermedad de Chagas, en la etapa crónica de la misma. Sin embargo, los estudios deben continuar para ajustar las dosis de los fármacos y lograr una mejor combinación de estas terapias.

Presentaciones a Congresos

- Simposio Internacional de Biología Celular y Molecular de la Enfermedad de Chagas, 2016, Santa Fe, Argentina.

Publicaciones relacionadas con este trabajo de tesina (<http://www.protozoologia.org.ar/Admin/mim/Libro%20de%20resumenes%20SAP2016.pdf>):

XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias - SIMPOSIO Internacional de Biología Celular y Molecular de la Enfermedad de Chagas
Noviembre 26, 27 y 28 de 2016 - Hotel UNL-ATE - Ciudad de Santa Fe

Libro de resúmenes

Sociedad Argentina de Protozoología

Autoridades

Presidente: Dr. Alejandro G. Schijman

Vicepresidente: Dra. Silvina Wilkowsky

Secretaria: Dra. Gabriela A. García

Prosecretaria: Dra. Karina A. Gómez

Tesorero: Dr. Guillermo Daniel Alonso

Protesorero: Dra. Silvia Fernández Villamil

Vocales Titulares: Dra. Silvia Longhi y Dr. Claudio Pereira

Vocal suplente: Dr. Juan Mucci y Dra. Alejandra Schoijet



75 - Estudio del efecto de co-administración de Clofazimina y Benidipina con Benznidazol en un modelo murino de Chagas crónico

María L Sbaraglini⁽¹⁾, Yésica Areco⁽²⁾, Cristian Miranda⁽³⁾, Carolina L Bellera⁽⁴⁾, Carolina Carrillo⁽⁵⁾, Bruno Buchholz⁽⁶⁾, Jazmín Kelly⁽⁷⁾, Ricardo Gelpi⁽⁸⁾, Alan Talevi⁽⁹⁾, Catalina D Alba Soto⁽¹⁰⁾

⁽¹⁾⁽⁴⁾⁽⁹⁾Laboratorio de Investigaciones y Desarrollo de Bioactivos, Facultad de Ciencias Exactas UNLP. ⁽²⁾⁽³⁾ ⁽¹⁰⁾Instituto de Microbiología y Parasitología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. ⁽⁵⁾Instituto Cesar Milstein. ⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA.E-mail: mariasbara@gmail.com

La enfermedad de Chagas es una endemia causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. En la actualidad, sólo existen dos fármacos aprobados para su tratamiento: Benznidazol (Bz), el tratamiento de primera línea; y Nifurtimox. La limitada efectividad en la etapa crónica de la enfermedad junto con los importantes efectos adversos de ambos fármacos ha impulsado la búsqueda y el desarrollo de nuevos tratamientos.

Nuestro grupo ha identificado mediante reposicionamiento de fármacos asistido por computadora, dos fármacos de uso clínico con actividad tripanocida: Benidipina (antihipertensivo) y Clofazimina (antibiótico). Ambos mostraron resultados alentadores tanto en modelos *in vitro* como en un modelo murino de Chagas agudo (reducción de parasitemia) y crónico (disminución de la inflamación y de la carga parasitaria en músculo estriado esquelético). En este trabajo hemos avanzado sobre el estudio de la combinación de Clofazimina y Benidipina con Bz en un modelo de infección crónica. Ratonés C3H fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa K98 (105 parásitos/ratón, intraperitoneal). La misma no es letal en la etapa aguda y genera importante daño en músculo esquelético y cardíaco en la etapa crónica. Luego de 90 días post-infección (dpi), los animales se dividieron en 5 grupos para su tratamiento por vía oral durante 30 días con Bz (75 mg/kg/día), Benidipina + Bz (15 y 30 mg/kg/día, respectivamente), Clofazimina + Bz (30 y 30 mg/kg/día, en ese orden), Bz (30 mg/kg/día) y controles (sin tratar). Se registró la evolución del peso corporal y el estado de los animales durante todo el ensayo, encontrando en el grupo tratado con Bz 75 una reducción del peso a partir del 150dpi, tal como lo ha descrito diversos autores. Se realizaron electrocardiogramas a los 120 y a los 170 dpi no encontrando diferencias significativas en la frecuencia cardíaca y la duración de los intervalos RR, PR o QT; sin embargo, el intervalo QRS presentó morfología aberrante en el 100% de los animales tratados con Bz 75, en un 50% del grupo Benidipina + Bz y en un 25% de los ratones sin tratamiento.

Bibliografía

- BELLERA CAROLINA L.; SBARAGLINI, Maria L.; FRACCAROLLI, Laura; VANRELL, M.C.; CASASSA, A F.; LABRIOLA, C.A.; ROMANO P S.; CARRILLO, Carolina; TALEVI, Alan. High-throughput drug repositioning for the discovery of new treatments for Chagas disease. 2015, vol. 15, n.3, p. 182-93. Mini Rev Med Chem.
- BERMUDEZ, J.; DEVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, JP.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. Apr. 2015. vol. 156, p. 1-16. Acta Trop
- BORGES, Bruna C.; UEHARA, Isadora A.; DIAS, Laysa O.S.; BRIGIDO, Paula C.; DA SILVA, Claudio V.; SILVA, Marcelo J.B. Mechanisms of Infectivity and Evasion Derived from Microvesicles Cargo Produced by Trypanosoma cruzi. 2016, vol. 6, n. 161. Front Cell Infect Microbiol.
- BUSTAMANTE, Juan M.; RIVAROLA, Hector W.; FERNANDEZ, Alicia R.; ENDERS, Julio E.; FRETES, Ricardo; PALMA, Jose A.; PAGLINI OLIVA, Patricia. Indeterminate Chagas' disease: Trypanosoma cruzi strain and re-infection are factors involved in the progression of cardiopathy. Abr. 2003, vol. 104, n. 4, p. 415-20. Clin Sci (Lond).
- CEVEY, AC.; MIRKIN, GA.; PENAS, FN.; GOREN, NB. Low-dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent Trypanosoma cruzi strain. Dic. 2017, vol. 12, n. 6, p. 12-22. Int J Parasitol Drugs Drug Resist.
- COALICION CHAGAS. [en línea].
 - <<http://www.infochagas.org/home>>
- CORONEL, MV.; FRUTOS, LO.; MUÑOZ, EC.; VALLE, DK.; ROJAS, DH. Adverse systemic reaction to benznidazole. Feb. 2017, vol. 50, n. 1, p. 145-147. Rev Soc Bras Med Trop
- DIAS LEMOS, Juliana R.; RODRIGUES, Wellington F.; BETELHO MIGUEL, Camila; CAMBRAIA PERREIRA, Ricardo; BOTELHO MIGUEL, Renata; ROGEIRO, Alexandre de Paula; FREIRE OLIVERA, Carlo J.; LAZO CHICA, Javier E. Influence of parasite load on renal function in mice acutely infected with Trypanosoma cruzi. Ago. 2013, vol. 8, n. 1, p 71772. PLoS One

-
- DIAZ, Martha L.; GONZALES, Clara I. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de Trypanosoma cruzi como una vía de transmisión re-emergente. Feb 2014, vol.46, n.2, p. 177-188.ISSN 0121-0807
 - FERNANDEZ RODRIGUEZ, Julianny C.; PARDO GODINHO, Joseane L.; DE SOUZA, Wanderley. Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure. 2014, vol 74, p.1-42.Subcell Biochem.
 - FERNÁNDEZ, ML.; MARSON, ME.;RAMÍREZ JC,MASTRANTONIO, G.; SCHIMAN, AG.;ALTCHEJ, J.;RIARTE,AR.;BOURNISSEN,FG.Pharmacokinetic and pharmacodynamic responses in adult patients with Chagas disease treated with a new formulation of benznidazole. Mar.2016,vol.111, n.3,p.218-21. Mem Inst Oswaldo Cruz.
 - FORSYTH, Colin J.; HERNANDEZ, Salvador; OLMEDO, Wilman; ABUHAMIDAH, Adieb; TRAINA, Mahmoud I.; SANCHEZ, Daniel R.;SOVEROW,Jonathan; MEYMANDI, Shaba.Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United. Oct.2016, vol. 63, n.8, p.1056-62. Clin Infect Dis.
 - GARCIA,MC.;PONC,NE.;SANMARCO,LM.;MARZO,H.;JIMENEZ KAIUZ,AF.;AOKI,MP.Clomipramine and Benznidazole Act Synergistically and Ameliorate the Outcome of Experimental Chagas Disease.May.2016,vol. 60, n.6, p.3700-8.Antimicrob Agents Chemother.
 - HIGUCHI, M de L.; BENVENUTTI, L.A.; MARTINS REIS, M.; METZGER,M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. Oct. 2003, vol.60, n. 1, p. 96-107. Cardiovasc Res.
 - LEVI, GC.; AMATO NEVO, V.; DE ARAUJO BEZARRA SANTANNA,IF. Side-effects of Ro 7-1051, a nitroimidazole used tentatively as a specific treatment for Chagas' disease. Jun.1975, vol17,n.1,p.49-52.Rev Inst Med Trop Sao Paulo
 - LEWIS, MD.;FORTES FRANCISCO,A.;TAYLOR,MC.;BURRELL SAWAD,H.;McLATCHIE, AP.;MILES,MA.;KELLY,JM.Bioluminescence imaging of chronic Trypanosoma cruzi infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. Sep.201. vol 16,n.9,p.1285-300.Cell Microbiol.

- MINISTERIO DE LA SALUD ARGENTINA. PRGRAMA NACIONAL DE CHAGAS. [en línea]. [Consulta 12 feb. 2017].
- <<http://www.infochagas.org/home>>
- MORILLO, Carlos A.; MARIN NETO, Jose A.; AVEZUM, Alvaro; SOSA ESTANI, Sergio; RASSI, Anis; ROSAS, Fernando; VILENA, Erick; QUIROZ, Roberto; BONILLA, Rina; BRITTO, Constanca; GUHL, Felipe; VELAZQUEZ, Elsa; BONILLA, Laura; MEEKS, Brandi, RAO MELACINI, Purnima; POQUE, Janice; MATTOS, Antonio; LAZDINS Janis; RASSI, Anis; CONNOLLY, Stuar J.; YUSUF, Salim. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. Oct.2015, vol.373, n.14, p. 1295-306. N Engl J Med.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS (TRIPANOSOMIASIS AMERICANA). [en línea].
- <<http://www.infochagas.org/home>>
- PAUCAR, Rocio; MORENO VIGURI, Elsa; PEREZ SILANES, Silvia .Challenges in Chagas Disease Drug Discovery: A Review. 2016, vol 23, n.28, p. 3154-3170. Curr Med Chem.
- PEREZ MOLINA, Jose A.; SOTO DORADO, Jesus; NORMAN, Francesca; MONGE MAILLO, Begoña; DIAZ MENENDEZ, Marta; ALBAJAR VIÑAS, Pedro; LOPEZ VELEZ, Rogelio. Nifurtimox therapy for Chagas disease does not cause hypersensitivity reactions in patients with such previous adverse reactions during benznidazole treatment. Ago 2013, vol. 127, n.2, p.101-4. Acta Trop
- PEREZ MOLINA, JA.; SOJO DORADO, J.; NORMAN, F.; MONGE MAILLO, B.; DIAZ MENENDEZ, M.; ALBAJAR VIÑAS, P.; LOPEZ VELEZ, R. Nifurtimox therapy for Chagas disease does not cause hypersensitivity reactions in patients with such previous adverse reactions during benznidazole treatment. Ago. 2013, vol. 127, n.2, p.101-4. Acta Trop.
- RAMOS, Simeone G.; MATTURRI, Luigi; ROSSI, Lino; ROSSI, Marcos .Sudden cardiac death in the indeterminate phase of Chagas' disease associated with acute infarction of the right carotid body. Dic. 1995, vol.52, n.3, p. 265-8. Int J Cardiol.
- RASSI, Anis Jr.; MARIN NETO, Jose A.; RASSI Anis. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological

treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. Feb 2017. Mem Inst Oswaldo Cruz.

- RODRIGUEZ MORALES, Olivia; MONTEON PADILLA, Victor ; CARRILLO SANCHEZ, Silvia C.; RIOS CASTRO, Martha, MARTINEZ CRUZ, Mariana; CARABANIN LIMA, Alejandro; ARCE FONSECA, Minerva. Experimental vaccines against Chagas disease: A journey through history. May.2015, doi: 10.1155/2015/489758. J Immunol Res.
- ROSSI, Marcos A.Connective tissue skeleton in the normal left ventricle and in hypertensive left ventricular hypertrophy and chronic chagasic myocarditis. Jul-Ago 2001, vol.7, n.4, p. 820-32.Med Sci Monit..
- SANMARTINO, Mariana. 100 años de Chagas (1909-2009): revisión, balance y perspectiva. [en línea]. 2009. [consulta 12 feb. 2017]. <<http://www.scielo.org.ar/img/revistas/rsea/v68n3-4/html/v68n3-4a01.htm>>
- SBARAGLINI, Maria Laura; BELLERA, Carolina L.; FRACCAROLI, Laura; LAROCCA, Luciana; CARRILLO, Carolina; TALEVI, Alan; ALBA SOTO, Catalina. Novel cruzipain inhibitors for the chemotherapy of chronic Chagas disease. Jul.2016, vol. 48, n.1, p. 91-5. Int J Antimicrob Agents
- TEIXEIRA, A.R.L.; NITZ, N.; GUIMARO,M.C.; GOMEZ, C. Chagas disease.Dic. 2006, vol. 82, n. 974, p. 788–798. Postgrad Med J.
- UMEMOTO, Seji; OGIHARA, Toshio; MATSUZAKI, Masunori; RAKUGI, Hiromi, OHASHI, Yasuo; SARUTA, Takao. Effects of calcium channel blocker benidipine-based combination therapy on target blood pressure control and cardiovascular outcome: a sub-analysis of the COPE tria. Dic 2016, doi: 10.1038/hr.2016.158. Hypertens Res
- VIOTTI,R.;VIGLIANO,C.;LOCOCCO,B.;ALVAREZ,MG.;PETTI,M.;BERTOCCHI,G.;ARMENTI ,A.Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities.Mar.2009,vol.7,n.2,p.157-63.Expert Rev Anti Infect Ther.
- ZELEDON, Rodrigo.A. Medical Microbiology. 4ta ed. University of Texas Medical Branch at Galveston: Chapter 82 Hemoflagellates, 1996. Editor: Samuel Baron.