

# SUSCEPTIBILIDAD *IN VITRO* DE AISLADOS DE *Trypanosoma cruzi* CIRCULANTES EN PARAGUAY A DROGAS UTILIZADAS EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Acosta Nidia<sup>1</sup>; Yaluff Gloria<sup>1</sup>; López Elsa<sup>1</sup>; Sanabria Luis<sup>1</sup>; Bobadilla Christopher<sup>1</sup>; Ramírez Analía<sup>1</sup>; Fernández Ivana<sup>1</sup>; Escobar Patricia<sup>2</sup>.

1. Departamento de Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay; 2. Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, CINTROP, Universidad Industrial de Santander, Colombia.

## INTRODUCCIÓN

El *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, muestra una sustancial heterogeneidad fenotípica y genotípica, que podría tener cierto grado de influencia en las variaciones epidemiológicas y clínicas observadas en esta enfermedad, así como en la sensibilidad a los fármacos utilizados en el tratamiento. Esta enfermedad constituye un importante problema de salud pública para los países afectados (1).

Actualmente dos medicamentos están disponibles y aprobados, nifurtimox y benznidazol. Sin embargo por ensayos *in vitro* e *in vivo* se ha reportado la existencia de cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes a estos fármacos, que podrían derivar en falla terapéutica (2, 3, 4). Así mismo, se ha observado que la resistencia puede ser inducida por diferentes presiones de la droga sobre el parásito, aspecto a tener en cuenta en el tratamiento de las personas infectadas, ya que la administración de dosis inadecuadas y discontinuas puede favorecer la aparición de cepas resistentes..

En el presente estudio se evaluó la susceptibilidad *in vitro* al benznidazol y al nifurtimox, de las formas epimastigotas de 20 cepas de *T. cruzi*, aisladas de diferentes hospederos en Paraguay, a fin de conocer si existen diferencias o no en cuanto a la susceptibilidad a estas drogas e identificar quizás a aquellas con resistencia natural, aspecto considerado de relevancia para la epidemiología de la enfermedad de Chagas.

## OBJETIVO

- Evaluar la susceptibilidad *in vitro* al benznidazol y al nifurtimox de aislados de *Trypanosoma cruzi* que circulan en el Paraguay.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Veinte aislados de *T. cruzi*, previamente clonados (5) y provenientes de diferentes hospederos de zonas endémicas para la enfermedad de Chagas en Paraguay, fueron incubados en medio LIT con diferentes concentraciones de nifurtimox y benznidazol, en placas de 96 pocillos por 72 horas a 28°C. Cada ensayo se realizó por triplicado. La viabilidad de los parásitos se determinó por recuento microscópico en cámara de Neubauer (parásitos/ml). La actividad tripanocida de las drogas fue expresada como la concentración necesaria para inhibir el crecimiento del parásito en un 50% y 90% (*IC50* e *IC90* respectivamente). Con los valores obtenidos en el recuento de parásitos se calcularon estos parámetros por un análisis de regresión lineal, utilizando el software Mxflit™ (ID Business Solution, Guildford, UK) y la significancia estadística por el análisis de varianza (ANOVA), con valores de  $p < 0.05$ , luego de la corrección de Bonferroni, utilizando el software JMP (SAS, Institute).

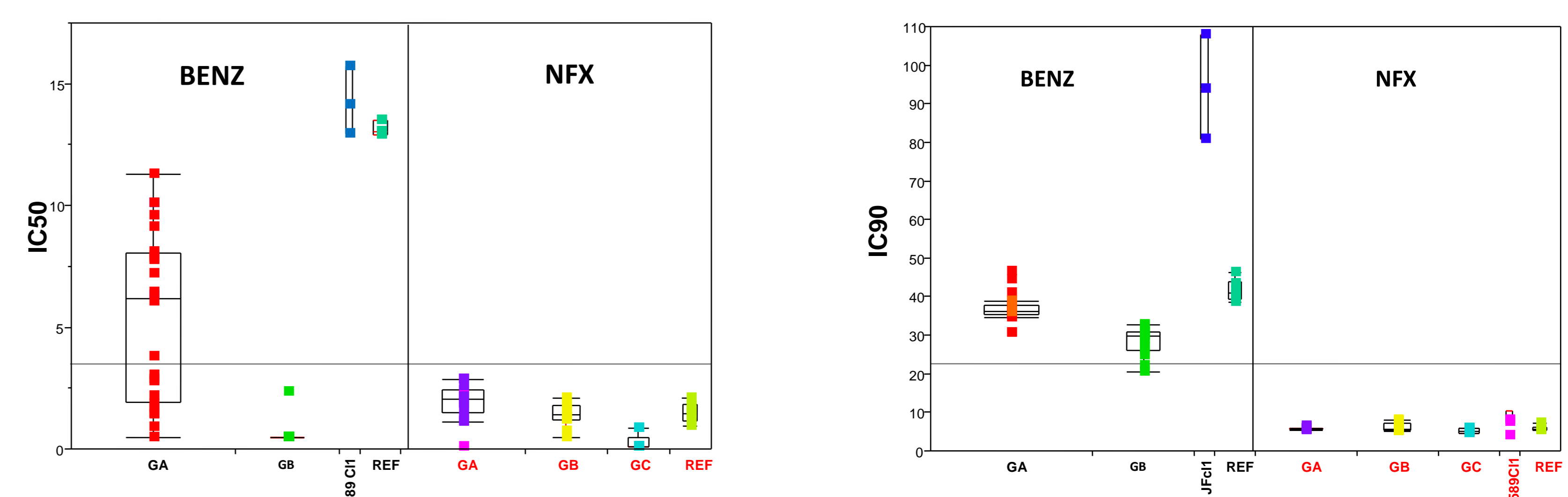
## RESULTADOS

Tabla 1. Características de las cepas estudiadas.

CEPA	UTD	HOSPEDERO	ORIGEN	BENZNIDAZOL		GRUPO	NIFURTIMOX		GRUPO
				<i>IC50</i>	<i>IC90</i>		<i>IC50</i>	<i>IC90</i>	
				( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )		( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	
RF cl1	TcII	HUM	COR	MEDIA $\pm$ DESVIO ESTÁNDAR	MEDIA $\pm$ DESVIO ESTÁNDAR	A	MEDIA $\pm$ DESVIO ESTÁNDAR	MEDIA $\pm$ DESVIO ESTÁNDAR	A
T530 CL1	TcV	T.i.	CHA	3,58 $\pm$ 0,23	34,56 $\pm$ 1,73	A	1,88 $\pm$ 0,07	5,59 $\pm$ 0,02	A
T532 CL4	TcV	T.i.	CHA	2,01 $\pm$ 0,23	33,45 $\pm$ 2,30	A	2,11 $\pm$ 0,06	5,72 $\pm$ 0,04	A
MA 26 CL1	TcIII	D.n.	CHA	4,25 $\pm$ 1,56	35,04 $\pm$ 1,10	A	2,77 $\pm$ 0,19	6,49 $\pm$ 0,17	A
MA 111 CL1	TcIII	E.s.	CHA	3,27 $\pm$ 1,32	34,13 $\pm$ 0,82	A	2,09 $\pm$ 0,10	5,77 $\pm$ 0,05	A
CON 11 cl1	TcII	T.i.	CON	2,17 $\pm$ 0,70	35,82 $\pm$ 0,45	A	1,23 $\pm$ 0,03	5,66 $\pm$ 0,12	A
ARMADILLO 20 cl2	TcIII	D.n.	CHA	3,54 $\pm$ 2,59	35,43 $\pm$ 0,62	A	1,98 $\pm$ 0,01	5,77 $\pm$ 0,03	A
T601 cl1	TcV	T.i.	CHA	5,35 $\pm$ 2,56	37,44 $\pm$ 0,32	A	2,35 $\pm$ 0,02	5,81 $\pm$ 0,04	A
AR cl1	TcII	HUM	CEN	4,89 $\pm$ 7,06	43,98 $\pm$ 2,78	A	1,29 $\pm$ 0,56	7,84 $\pm$ 0,21	B
LENGUA15 cl1	TcVI	T.i.	CHA	3,56 $\pm$ 3,81	35,86 $\pm$ 1,13	A	1,10 $\pm$ 0,57	5,38 $\pm$ 0,09	B
T595 cl2	TcV	T.i.	CHA	7,69 $\pm$ 0,45	36,67 $\pm$ 0,29	A	1,29 $\pm$ 0,01	5,35 $\pm$ 0,08	B
MA 239 cl2	TcIII	D.n.	S.P.	4,94 $\pm$ 4,51	32,32 $\pm$ 2,87	A	0,93 $\pm$ 0,09	6,07 $\pm$ 0,07	C
JF cl1	N.D.	HUM	AMA	8,67 $\pm$ 2,05	94,29 $\pm$ 13,61	**	1,84 $\pm$ 0,28	5,79 $\pm$ 0,12	B
T589	TcV	T.i.	CHA	14,28 $\pm$ 1,37	37,52 $\pm$ 1,47	**	2,87 $\pm$ 0,68	9,57 $\pm$ 1,22	**
CON 5 cl2	TcII o TcV	T.s.	CON	< 0,625	28,44 $\pm$ 1,49	B	< 0,156	5,78 $\pm$ 0,23	B
MA 87 cl1	TcIII	D.n.	CHA	< 0,625	31,47 $\pm$ 1,17	B	< 0,156	6,12 $\pm$ 0,01	B
T592 cl1	TcV	T.i.	CHA	< 0,625	28,81 $\pm$ 2,54	B	< 0,156	5,23 $\pm$ 0,23	B
ARMADILLO 9 cl1	TcII	D.n.	CHA	< 0,625	31,19 $\pm$ 1,35	B	< 0,156	6,45 $\pm$ 0,02	B
MJ cl2	ND	HUM	ND	< 0,625	31,16 $\pm$ 1,34	B	< 0,156	4,68 $\pm$ 0,03	C
CHACO 32 cl2	TcIII	T.i.	CHA	< 0,625	22,49 $\pm$ 2,15	B	< 0,156	5,19 $\pm$ 0,04	C
Y*	TcII	HUM	BRA	13,74 $\pm$ 5,86	43,74 $\pm$ 2,47	REF	1,50 $\pm$ 0,26	6,25 $\pm$ 0,86	REF
CL Brener*	TcVI	T.i.	BRA	13,16 $\pm$ 0,30	39,59 $\pm$ 0,91	REF	1,49 $\pm$ 0,59	5,61 $\pm$ 0,20	REF

UTD: unidades taxonómicas discretas (6). HUM: humano, T.I.: *Triatoma infestans*, D.n.: *Dasypus novemcinctus*, E. s.: *Euphractus sexcinctus*. CHA: Chaco, CON: Concepción, SP: San Pedro, COR: Cordillera, AMA: Amambay, BRA: Brasil, REF: cepas de referencia. ND: no determinado. \*\* por separado.

Gráfico 1. Comparación de los valores de *IC50* y de *IC90* de los grupos conformados con aislados de *Trypanosoma cruzi* de Paraguay, en ensayos *in vitro* con benznidazol y nifurtimox.



Diagramas de caja mostrando la distribución de los valores de *IC50* e *IC90*, obtenidos de los ensayos realizados por triplicado con cada una de las cepas, según grupo y fármaco. Se indican los percentiles 90 y 10, la mediana y el intervalo de confianza. BENZ: benznidazol, NFX: nifurtimox, REF: cepas de referencia.

## CONCLUSIONES

Los aislados evaluados fueron más susceptibles al nifurtimox que al benznidazol, con valores de *IC50* e *IC90* variables entre sí.

El análisis estadístico permitió clasificar a las cepas de Paraguay en dos grupos (grupos A y B), con diferencias significativas en cuanto a la susceptibilidad al benznidazol ( $p < 0.0001$ ), y en tres grupos (A, B y C) con respecto al nifurtimox ( $p < 0.0001$ ).

Estas diferencias en la susceptibilidad no guardaron relación con el UTD, tipo de hospedero y procedencia.

Una cepa aislada de un caso humano fue la que mostró el valor más alto de *IC90* ( $94,29 \pm 13,61 \mu\text{g/mL}$ ) con el benznidazol, mientras que con una cepa aislada de una vinchuca domiciliar se obtuvieron los valores más altos de *IC50* con ambas drogas testadas ( $IC50_{BZ} = 14,28 \pm 1,37 \mu\text{g/mL}$ ;  $IC50_{NX} = 2,87 \pm 0,68 \mu\text{g/mL}$ ).

Este estudio refuerza la importancia del estudio de cepas locales en cuanto a la respuesta a la drogas, para un mejor entendimiento del comportamiento biológico de las poblaciones circulantes de *T. cruzi* en nuestro país, aspecto considerado de relevancia en la epidemiología de esta enfermedad.

## REFERENCIAS

- World Health Organization. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record*, 90, 33-43.
- Filardi LS, Brener Z (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 81:755-759.
- Luna KP, Hernández IP, Rueda CM, Zorro MM, Croft SL, Escobar P (2009). *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. *Biomédica*. 29(3):448-55.
- Mejía AM, Hall BS, Taylor MC, Gómez-Palacio A, Wilkinson SR, Triana-Chávez O, Kelly JM (2012). Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *J Infect Dis*. 206(2):220-8.
- Yeo, M., Lewis, M.D., Carrasco, H.J., Acosta, N., Llewellyn, M., da Silva Valente, S.A.,... Miles, M.A. (2007). Resolution of multiclonal infections of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected triatomine bugs and from experimentally infected mice by direct plating on a sensitive solid medium. *International Journal for Parasitology*, 37(1), 111-120.
- Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M.,... Sturm NR. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240-253.