

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**Efectos del pamidronato y la amiodarona sobre  
aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi*.**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**  
Presentado ante la ilustre  
Universidad Central de Venezuela  
por el bachiller Javier Acevedo Da  
Silva como requisito para optar al  
título de Licenciado en Biología.

**Tutores: Dr. Roschman González**  
**Dra. Nereida Parra**

**Caracas, Venezuela**

**Mayo – 2014**

# INDICE GENERAL

Introducción.....	1
• Origen de <i>T. evansi</i> .....	1
• Descripción de <i>T. evansi</i> .....	2
• Clasificación Taxonómica .....	3
• Transmisión y ciclo de vida de <i>T. evansi</i> .....	4
• Patología de la enfermedad.....	7
• Quimioterapia contra la tripanosomosis equina.....	11
• Nuevos Enfoques Quimioterapéuticos.....	12
○ Bifosfonatos.....	13
○ Amiodarona.....	14
Antecedentes.....	16
• Crecimiento de <i>T. evansi</i> “ <i>in vitro</i> ”.....	16
• El pamidronato y la amiodarona.....	16
• Alteraciones Ultraestructurales.....	18
Objetivos.....	20
Materiales y Métodos.....	21
• Material biológico.....	21
• Drogas.....	21
• Métodos.....	22
• Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> .....	22
○ Obtención de <i>T. evansi</i> .....	22
○ Preparación de la columna cromatográfica.....	22
○ Extracción de la sangre infectada.....	23
○ Purificación de los Tripanosomas.....	23
○ Cultivos de células VERO.....	23
○ Cultivos <i>in vitro</i> .....	23
• Evaluación del efecto de las drogas en los cultivos <i>in vitro</i> .....	25
• Evaluación del efecto de las drogas <i>in vivo</i> .....	26
○ Reactivación de los aislados de <i>T. evansi</i> .....	26
○ Inoculo de ratones con aislados de <i>T. evansi</i> .....	26
○ Pruebas con pamidronato y amiodarona.....	26

• Determinación de variables morfométricas.....	26
• Microscopia electrónica de transmisión.....	27
○ Fijación.....	27
○ Deshidratación.....	28
○ Infiltración.....	28
○ Inclusión.....	28
○ Corte y Contraste.....	28
○ Observación.....	29
• Análisis cuantitativo de los resultados.....	29
Resultados.....	30
• Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> .....	30
• Evaluación del efecto de las drogas en los cultivos <i>in vitro</i> .....	32
○ Pamidronato.....	32
○ Amiodarona.....	35
○ Pamidronato + Amiodarona.....	37
• Evaluación del efecto de las drogas <i>in vivo</i> .....	39
• Morfometría de frotis sanguíneos.....	46
○ Longitud Corporal.....	48
○ Ancho Corporal.....	49
• Ultraestructura.....	49
○ Grupos control.....	50
○ TEVA1 a los 7 días post-infección.....	51
○ FRIO a los 7 días post-infección.....	52
○ FRIO a los 16 días post-infección.....	53
Discusión.....	55
• Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> .....	55
• Evaluación del efecto de las drogas en los cultivos <i>in vitro</i> .....	58
• Evaluación del efecto de las drogas <i>in vivo</i> .....	63
○ Parasitemia y sobrevida.....	63
○ Peso.....	65
• Morfometría de frotis sanguíneos.....	67
• Análisis Ultraestructural.....	68
Conclusiones.....	71
Bibliografía.....	72

## INDICE DE FIGURAS

Vectores de transmisión de Trypanosomatídeos.....	4
Ciclo de vida de T. evansi.....	6
Distribución geográfica de T. evansi.....	7
Ruta metabólica de biosíntesis de isoprenoides.....	11
Crecimiento in vitro de TEVA1 con Pamidronato.....	32
Crecimiento in vitro de FRIO con Pamidronato.....	33
Curva dosis-respuesta para pamidronato sobre TEVA1 y FRIO.....	34
Crecimiento in vitro de TEVA1 con amiodarona.....	35
Crecimiento in vitro de FRIO con amiodarona.....	36
Curva dosis-respuesta para amiodarona sobre TEVA1 y FRIO.....	36
Crecimiento in vitro de TEVA1 con pamidronato + amiodarona.....	37
Crecimiento in vitro de FRIO con pamidronato + amiodarona.....	38
Isoblograma para pamidronato y amiodarona.....	39
Peso de los ratones no infectados + tratamiento.....	40
Peso de los ratones infectados con TEVA1 + tratamiento.....	41
Peso de los ratones infectados con FRIO + tratamiento.....	42
Sobrevida de los ratones infectados con TEVA1 + tratamiento.....	43
Sobrevida de los ratones infectados con FRIO + tratamiento.....	44
Desarrollo de la parasitemia de los ratones infectados con TEVA1 + tratamiento.....	45
Desarrollo de la parasitemia de los ratones infectados con FRIO + tratamiento.....	46
Imágenes de extendidos sanguíneos con TEVA1.....	47
Imágenes de extendidos sanguíneos con FRIO.....	47
Variaciones de la longitud corporal durante la infección experimental.....	48

Variaciones del ancho corporal durante la infección experimental.....	49
Ultraestructura de parásitos que no fueron sometidos a tratamiento.....	50
Ultraestructura del aislado TEVA1 tratado con pamidronato al día 7 post-infección...	51
Ultraestructura del aislado FRIO tratado con pamidronato al día 7 post-infección.....	52
Ultraestructura del aislado FRIO tratado con pamidronato al día 16 post-infección.....	53

## **INDICE DE TABLAS**

Composicion de los medios de cultivo empleados.....	24
Diseño experimental de los ensayos in vitro.....	25
Diseño experimental para los ensayos in vivo.....	26
Sobrevivencia de las poblaciones parasitarias cultivadas en PBSG.....	30
Sobrevivencia de las poblaciones parasitarias cultivadas en DMEM.....	31
Sobrevivencia de las poblaciones parasitarias cultivadas en RPMI.....	31

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Origen de *Trypanosoma evansi*

Hoare postuló en 1972 que una cepa de *T. brucei* se adaptó a un modo de transmisión mecánico del hospedador invertebrado al mamífero, modificando así su ciclo de vida que incluía una fase dentro de la mosca tsetse (*Glossina morsitsan*). Esta adaptación es, según Hoare (1972), el origen evolutivo de *T. evansi* a partir de una cepa antigua de *T. brucei* con independencia del intermediario invertebrado y con una forma rápida y mecánica de transmisión.

La historia de *T. evansi* comienza en 1880, cuando el inglés Griffith Evans describe por primera vez un tripanosoma patógeno diagnosticado en camellos y equinos del distrito de Punjab, India. Luego de ocho años de controversia, Balbiani fue quien ubicó por primera vez al agente etiológico de la “surra” en el género *Trypanosoma* (Hoare 1972).

En Venezuela, las primeras observaciones de la tripanosomosis causada por *Trypanosoma evansi* fueron hechas por Llamozas en 1826 quien denominó “epizootia equina” a una afección en los caballos caracterizada por la pérdida de control en las extremidades posteriores, localmente llamada “derrengadera”. (Canelón y Meléndez, 2003). No obstante fue Rafael Rangel en 1905 quien inició el estudio sistemático que terminó por relacionar a *Trypanosoma evansi* con la patología equina antes mencionada. Rangel extrajo muestras de caballos con síntomas de “derrengadera” en El Rastro (una localidad en los llanos Venezolanos) en las que al microscopio óptico logró distinguir un movimiento de glóbulos rojos característico de la sangre contaminada con tripanosomas (Rangel, 1905). Rangel, envió extendidos de esta sangre a Felix Mesnil, quien, al estudiarlos, encontró semejanzas notables con el *T. equinum*, agente etiológico del “Mal de Caderas” sudamericano y, especialmente, con el *T. evansi*, entidad patógena responsable de la surra en el viejo mundo. Tomando en consideración estas observaciones y el país de procedencia, lo designa *T. venezuelense* sin especificar si se trata de una especie nueva o, por el contrario, de una variedad del *T. evansi* (Mesnil, 1910, citado por Brun y col., 1998). Esta polémica fue alimentada por los estudios de Leger y Tejera (1920) quienes indicaron que *T. evansi* y *T. venezuelense* presentaban diferencias morfológicas, inmunológicas y de reactividad farmacológica, suficientes como para separarlos en especies diferentes.

Para concluir la controversial discusión, Gibson y col. (1978), Mahmoud y Gray (1980), Losos (1980) y Molyneux y Ashford, (1983) confirmaron la hipótesis de Hoare (1956, 1964, 1972) de que *T. hippicum*, *T. equinum*, *T. venezuelense* y *T. evansi* no presentan diferencias morfológicas que sustentan la existencia de diferentes epítetos específicos por lo cual, en conclusión, las diferentes denominaciones descritas en la literatura corresponden a “razas” geográficas y constituyen en consecuencia sinonimias de *T. evansi*.

### 1.2 Descripción de *Trypanosoma evansi*

Según Tejero et al. (2008) *Trypanosoma evansi* es un protozoo hemoflagelado de importancia veterinaria debido a que infecta a una variedad de grandes mamíferos entre los que se incluyen caballos, camellos, búfalos, venados y ganado doméstico, causando la enfermedad conocida como surra. Morfológicamente se describe como una especie monomórfica que presenta una membrana ondulante bien desarrollada y contigua al flagelo libre, cinetoplasto redondeado y pequeño ubicado en el extremo posterior y núcleo redondeado y compacto que ocupa una posición central (Hoare, 1972). Las dimensiones de los aislados Venezolanos oscilan entre 18 y 36  $\mu\text{m}$  de largo y de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de ancho (Hoare op cit.).

Ultraestructuralmente, *T. evansi* muestra características similares a las de otros tripanosomas de la sección Salivaria (Vickerman, 1997). Una membrana plasmática con aspecto trilaminar, la capa interna de mayor densidad electrónica con un espesor que varía entre 10 y 15 nm. Inmediatamente por debajo de la membrana plasmática, una red de microtúbulos subpeliculares formada por unidades de 20 nm de diámetro que se extiende de un extremo a otro del parásito y constituye parte del citoesqueleto de estos microorganismos (Arenas, 1987). El núcleo presenta la estructura general del núcleo eucariota, rodeado por un envoltorio compuesto de dos membranas yuxtapuestas y porosas, el nucléolo es central, prominente y notablemente electrondenso. Durante la división del organismo se puede apreciar la dispersión de la cromatina, aparición de microtúbulos intracelulares y placas densas (Solari, 1995). Por su parte el sistema locomotor es una estructura compleja que presenta un solo flagelo, el cual se inserta en una invaginación citoplasmática denominada saco flagelar y emerge del cuerpo basal situado por lo

general entre el saco flagelar y el cinetoplasto. Dicho flagelo tiene la típica estructura de nueve pares de microtúbulos dispuestos en anillo con un par de microtúbulos centrales. (De Souza, 1984) El citoplasma contiene gran cantidad de gránulos y vesículas que se clasifican morfo-ultraestructuralmente mediante criterios subjetivos de densidad electrónica y tamaño. Los de alta densidad corresponden al grupo de los gránulos tipo I: lisosomas, y los gránulos de tipo II: materiales lipídicos, glico-proteicos y lipo-proteicos (De Souza, op cit.).

### 1.3 Clasificación taxonómica

De acuerdo a Corlis en 1994, éste propone la clasificación taxonómica para *Trypanosoma evansi* de la siguiente manera:

Dominio: Eukarya

Reino: Protozoa

Phylum: Euglenozoa

Clase Kinetoplastida

Orden Trypanosomatina

Familia: Trypanosomatidae

Género: Trypanosoma

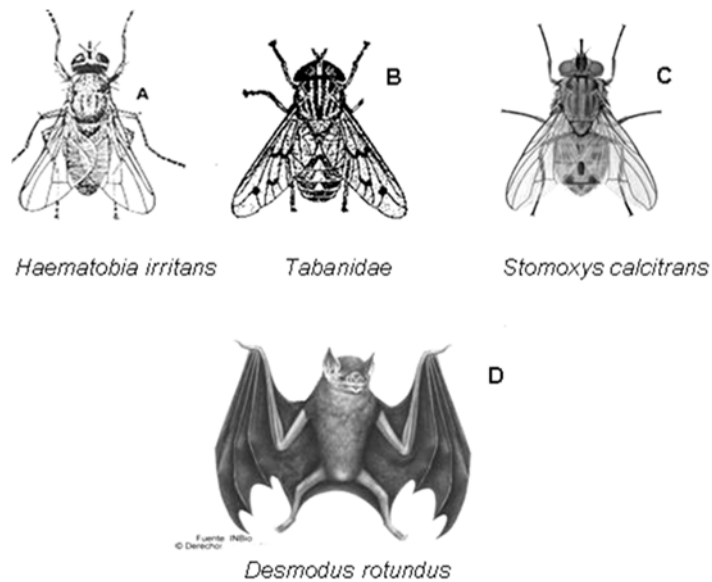
Especie: *Trypanosoma evansi*

También Hoare (1972) realizó una clasificación sin carácter taxonómico que fragmenta al género *Trypanosoma* en dos Secciones, Stercoraria y Salivaria. Esa clasificación confiere gran practicidad al estudio de los tripanosomas infectantes de mamíferos. La sección Stercoraria agrupa a los tripanosomas transmitidos por medio de las heces del hospedador invertebrado, por ejemplo *T. cruzi*; a diferencia de la sección Salivaria que incluye solo a los tripanosomas que son transmitidos por inoculación de saliva del insecto vector infectado, como es el caso de *T. evansi*.



#### 1.4 Transmisión y ciclo de vida de *T. evansi*.

En el Continente Americano, las cepas de tripanosomas, a diferencia de las cepas africanas son transmitidas mecánicamente por sus vectores; esto implica que el parásito no sufre cambios morfológicos en el insecto que le sirve de vehículo. Entre los vectores que están involucrados en esta forma de transmisión se encuentran los hematófagos de la familia *Tabanidae*, la mosca brava *Stomoxys calcitrans* y *Haematobia irritans*, siendo el tábano el vector mecánico más importante de la tripanosomosis en América (Hoare, 1972, Soulsby, 1987; Luckins 1998; Rivera, 1996) (Figura 1).



**Figura 1. Principales vectores de transmisión de *T. evansi* en el continente americano. (Tomadas de [http://ipm.ncsu.edu/AG369/notes/horse\\_flies.html](http://ipm.ncsu.edu/AG369/notes/horse_flies.html)).**

De los vectores mencionados anteriormente, *Tabanidae* es el que se encuentra mejor adaptado para la transmisión mecánica debido a la morfología de las partes bucales las cuales le confieren una combinación de partes succionadoras y partes lamedoras (Luckins, 1998). La existencia de esta gran diversidad de agentes transmisores hace más difícil la tarea de controlar la transmisión de la tripanosomosis.

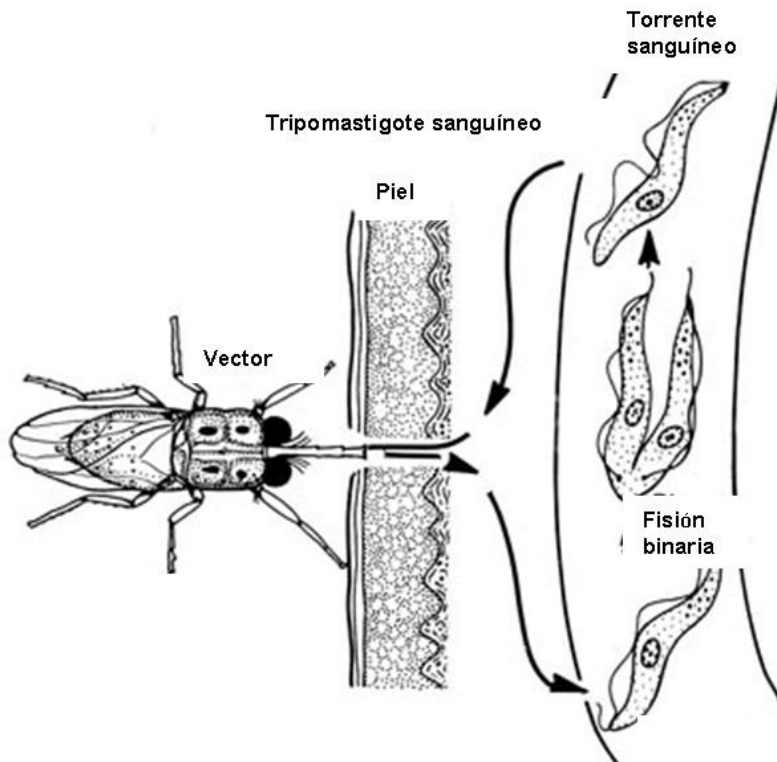
Por otro lado, de acuerdo a Hoare (1972), la transmisión de *T. evansi* puede realizarse también a través de murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus*) (Figura 1), esta transmisión es conocida como contaminación oro-digestiva. El autor señala que estos animales se infectan a través de la mucosa oral cuando se alimentan de la sangre de animales parasitados por *T. evansi*, y no llegan a sufrir la enfermedad, comportándose entonces como reservorio del parásito. El murciélago generalmente ingiere un volumen de 10-15 ml de sangre en cada comida, y debido a la multiplicación de los parásitos en la sangre ingerida, puede aumentar la posibilidad de transmisión a otro animal a través de la mordedura. Estos animales son muy eficientes como vectores, ya que la membrana de la mucosa oral no representa una barrera importante para el parásito. Debido a que en este caso se produce multiplicación del parásito, el murciélago es considerado como un vector biológico (Desquesnes, 2004).

Dentro de las formas de transmisión mecánica, es importante señalar la transmisión iatrogénica, cuyo nombre se deriva de *iatros* (médico) y *génesis* (crear), y se produce generalmente al utilizar agujas e instrumentos quirúrgicos contaminados con sangre parasitada por tripanosomas, durante períodos de vacunación masiva en los rebaños. Este tipo de transmisión, aún cuando no es reconocida desde el punto de vista epidemiológico, tiene gran importancia por el gran número de animales que pueden ser infectados (Jones y Dávila, 2001).

La eficiencia de transmisión por parte de los vectores depende adicionalmente de otros factores. Por un lado, el grado de infección en el hospedador (Infección aguda o crónica) y el nivel de parasitemia en el momento de la picadura. Adicionalmente, la influencia de estaciones climáticas afecta la densidad de la población de los insectos vectores y por lo tanto, la oportunidad para la transmisión. Otros factores tales como la presencia de reservorios, la inclusión de animales infectados o la introducción de animales susceptibles pudieran actuar como elementos potenciadores de la prevalencia de la enfermedad (Luckins, 1998; Luckins and Dwinger, 2004)

En cuanto al ciclo de vida de *T. evansi*, a diferencia de lo que sucede con otros tripanosomas, es sencillo, en el cual solo interviene un vector y el hospedador, sin producirse cambios morfológicos del parásito en ninguno de éstos, ya que es monomórfico y la transmisión

es fundamentalmente mecánica en los insectos vectores (Figura 2). Durante la picadura del vector, el parásito pasa desde las partes bucales, donde tiene un tiempo de vida limitado, hacia el torrente sanguíneo del hospedador donde continúa su multiplicación por fisión binaria. El ciclo se completa cuando el hospedador es picado o mordido nuevamente y el vector extrae sangre contaminada con tripanosomas que serán inoculados en otro animal.



**Figura 2.** Ciclo de Vida e infección general para tripanosomas de la sección salivaria. (Tomado de Gardiner CH, Fayer R, Dubey JP: An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues, Agriculture Handbook #651. United States Department of Agriculture, Washington, DC, 1988, p.3) modificado.

Este ciclo de vida tan particular, en el que vectores y reservorios están ampliamente distribuidos a nivel mundial hace que *Trypanosoma evansi* sea el tripanosomatídeo más ampliamente distribuido en el mundo (Hoare, 1972), lo cual está representado gráficamente en la figura 3.



**Figura 3.** Las regiones geográficas de tono más oscuro representan la distribución de *Trypanosoma evansi* en el mundo (modificado de <http://www.fao.org/>).

En ese contexto, es importante señalar que la tripanosomosis provocada por *T. evansi* es una enfermedad causante de brotes con alta mortalidad en caballos que afecta ampliamente regiones de América del Sur dedicadas a la explotación de ganadería bovina extensiva, generando así grandes pérdidas económicas. Por esta razón el género *Trypanosoma* está asociado con los daños infligidos, directa e/o indirectamente, a los seres humanos, hecho que lo ha convertido en tema central de numerosas investigaciones, orientadas primordialmente, a su erradicación (Tejero y col., 2008).

### 1.5 Patología de la enfermedad

*T. evansi* es patógeno para un gran número de animales domésticos y silvestres, sin embargo, el efecto de la infección varía considerablemente de acuerdo con la susceptibilidad del hospedador y la virulencia de la cepa del parásito (Hoare, 1972; Luckins, 1998; Brun *et.al.* 1998). La enfermedad es más severa en camellos, caballos, búfalos y perros; mientras que los bovinos son afectados de una forma moderada. Las infecciones por *T. evansi* es una de las más frecuentes en camellos en el norte de África, generando grandes pérdidas económicas (Taylor and Authié, 2004).

Los signos clínicos de esta tripanosomosis se caracterizan por fiebre y anemia, seguida de emaciación, edema, caquexia y aumento del tamaño de los nódulos linfáticos y del bazo.

Posteriormente aparecen síntomas neurológicos característicos de la enfermedad. Pueden ocurrir abortos durante la preñez (Luckins, 1999).

El estado agudo de la enfermedad, que dura aproximadamente 3 meses, se caracteriza por aumento y tumefacción de los nódulos linfáticos, edemas subcutáneos, urticaria, anemia y ocasionalmente oftalmítis. En caballos y camellos generalmente se desarrolla esta forma de la enfermedad, causando la muerte de los animales en pocas semanas o meses, siendo afectado principalmente el sistema nervioso (Luckins, 1998). En algunas observaciones de infecciones naturales en caballos, el curso de la enfermedad varía de 2 a 20 días (Rodrigues *et. al.* 2009).

La tripanosomosis crónica, forma más común de la enfermedad en las áreas endémicas, aparece con pérdida progresiva de peso, condición física y la función reproductiva y puede alargarse por años hasta la muerte del animal; sin embargo algunos individuos pueden sobrevivir a infecciones crónicas y ocurrir una eventual autocura. En el estado crónico los signos clínicos son menos distintivos, pero se puede presentar fiebre recurrente, anemia, emaciación, edema, conjuntivitis y lagrimación, agrandamiento de los nódulos linfáticos y bazo, pérdida de la coordinación motora, terminando en parálisis y abortos (Losos, 1986; Luckins, 1998; Taylor and Authié, 2004).

Las infecciones en caballos en Africa y Asia son severas y similares a las causadas por *T. b. brucei*, presentando edema y parálisis total. En América del Sur, son menos severas y causan el síndrome crónico; las infecciones en bovinos en esta región a menudo son asintomáticas, mientras que en Asia se desarrollan de forma crónica (Taylor and Authié, 2004). En animales domésticos como ovinos y caprinos se desarrolla también el estado crónico, pudiendo persistir por muchos años (Onah *et. al.* 1998). En algunos animales silvestres como los chigüires o capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) no se evidencian signos clínicos de la enfermedad, por lo que pueden ser considerados como reservorios del parásitos (Arias *et. al.* 1997).

## 1.6 Importancia de los Isoprenoides en tripanosomatideos

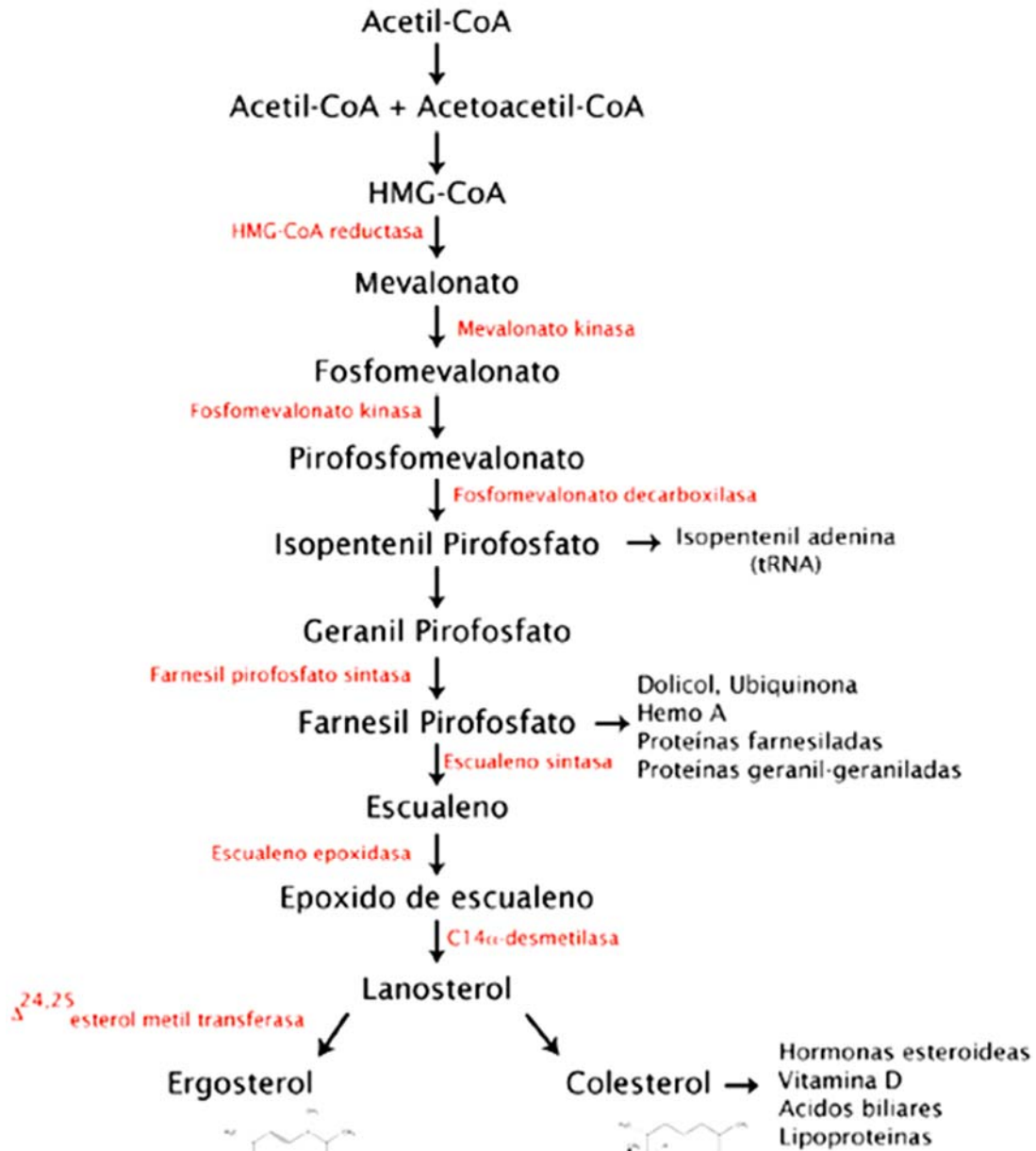
En general en los tripanosomatideos, los lípidos totales ocupan alrededor del 15 -20 % de su peso húmedo. Están constituidos principalmente por lípidos polares como fosfolípidos y lípidos neutros como triacilglicéridos y esterol. La ruta de biosíntesis de isoprenoides reviste una gran importancia en tripanosomatideos debido a que conduce finalmente a la síntesis de ergosterol, el cual es el principal esterol para estos organismos, a diferencia del esterol mayoritario en las células de mamíferos, que es el colesterol.

Debido a la gran importancia que representa el esterol para los tripanosomatideos, la inhibición de la ruta de biosíntesis de isoprenoides se ha convertido en una estrategia de gran interés en la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos antiprotozoarios (Urbina, 1997).

La síntesis de isoprenoides es una de las rutas metabólicas más complejas en células eucariotas, en la cual ocurren una serie de reacciones que puede agruparse en tres etapas esenciales (Figura 4):

1. Conversión de acetil-CoA en mevalonato. La primera reacción esta catalizada por la tiolasa y condensa dos moléculas de acetil-CoA para producir acetoacetil-CoA. Luego otra moléculas de acetil-CoA reacciona con el acetoacetil-CoA produciendo 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), mediante la acción de la HMG-CoA sintasa. Finalmente la enzima HMG-CoA reductasa dependiente de NADPH se encarga de reducir al HMG-CoA hasta mevalonato. Particularmente en mamíferos, la enzima HMG-CoA reductasa representa un punto limitante de la velocidad de síntesis de colesterol.
2. Conversión de mevalonato en escualeno. El mevalonato debe ser doblemente fosforilado y descarboxilado hasta convertirse en isopentil pirofosfato, que se isomeriza a dimetil-alil pirofosfato. Luego se produce geranil pirofosfato (GPP), que reacciona con otra molécula de isopentil pirofosfato (IPP) para dar farnesil pirofosfato. Ambas reacciones son catalizadas por la enzima farnesil pirofosfato sintasa (FPPS). Finalmente se produce la condensación de dos moléculas de farnesil pirofosfato, mediante la acción de la escualeno sintasa (SQS), produciendo escualeno.

3. Conversión del escualeno en colesterol o ergosterol. Esta es la última etapa donde se diferencian la ruta de biosíntesis de esteroides de mamíferos y tripanosomatídeos. Primero el escualeno sufre un proceso de ciclación para dar lugar a lanosterol, molécula de 30 carbonos que luego de varias transformaciones, da origen al colesterol en células de mamífero, a partir de las cuales se sintetizan hormonas esteroideas, vitamina D, lipoproteínas, etc. En el caso de los tripanosomatídeos, el lanosterol sigue otra ruta, generando ergosterol (de 28 carbonos), que es el principal esteroide en tripanosomatídeos.



**Figura 4:** Descripción de la ruta metabólica para la biosíntesis de isoprenoides (imagen tomada de: Sealey, 2007).

### 1.7 Quimioterapia contra la tripanosomosis equina

El uso de drogas para el tratamiento de la tripanosomosis animal ha sido importante durante muchas décadas, siendo éste el método más efectivo para el control de las infecciones causadas



por *T. evansi*, dado que el desarrollo de vacunas en los últimos años han sido infructuosos, debido al mecanismo de evasión de la respuesta inmune de estos parásitos.

Particularmente en nuestro país las drogas más comunmente usadas en la ganadería, son: el isometamidium, el berenil y el homidium (Witola y col., 2005, Girgis y col., 1974). Sin embargo, estas drogas se encuentran en el mercado desde hace más de 50 años, lo que sugiere que los esfuerzos para desarrollar nuevas terapias han ido muy lentamente, y más importante aún que los parásitos hayan desarrollado una resistencia a éstos fármacos.

Se ha reportado el desarrollo y uso de otra droga tripanocida contra *T. evansi* y *T. brucei*, la melarsamina hidrocloreto (Cymelarsan o Melarsoprol) (Raynaud y col., 1989). Esta droga es un derivado trivalente de una droga arsenical, efectiva en infecciones experimentales en ratones (Zweygarth y col., 1992), así como “*in vitro*” (Zweygarth y Kaminsky, 1990; Zhang y col., 1992). Sin embargo, también se ha demostrado resistencia para esta droga tanto en ratones como “*in vitro*” (Osman y col., 1992).

Algunas de las drogas quimioproliféricas más antiguas como los derivados de quinapiramina, el cloruro de isometamidio (trypanidum) y la suramida son usadas todavía y dan protección efectiva contra la infección con *T. brucei* en caballos, camellos y ganado (Peña, 2000). Aun así, no han sido totalmente efectivas; se han descrito una gran cantidad de efectos colaterales que son adversos al hospedador (Benitez y col. 1984) y el parásito ha demostrado capacidad para volverse resistente a estas terapias, por lo cual su uso sostenido en el tiempo está limitado (Womack y col., 2006).

### 1.8 Nuevos enfoques quimioterapéuticos

Estas limitaciones que implican la toxicidad de la droga y la resistencia por parte del parásito, conllevan directamente a la búsqueda permanente de nuevos enfoques que implican el desarrollo de drogas más efectivas, con menos efectos secundarios y la evaluación de nuevos posibles blancos terapéuticos.

### 1.8.1 Bisfosfonatos

Durante los últimos años ha cobrado interés el estudio del efecto de ciertas drogas que han sido ampliamente para tratar patologías humanas, tal es el caso de los bisfosfonatos. Estos fármacos son compuestos sintéticos análogos de pirofosfato en los que ha sido sustituido el átomo de oxígeno que aparece entre los dos átomos de fósforo por un átomo de carbono, y son usados en la actualidad para combatir afecciones óseas como: resorción ósea, metástasis ósea, osteolitis, etc, (Rodan, 2000, Rodan y Martin, 2000)

Gracias a su gran parecido con el pirofosfato cálcico y a su resistencia a pirofosfatasa ácida y alcalina, los bisfosfonatos pueden anclarse a la superficie mineral del hueso con gran afinidad, en donde son selectivamente internalizados por los osteoclastos (células involucradas en la resorción ósea) mediante endocitosis. Luego de la acumulación selectiva de los bisfosfonatos en los osteoclastos, estos compuestos son capaces de conducir a las células hacia apoptosis.

Algunos bisfosfonatos no son metabolizados por el osteoclasto y provocan la apoptosis mediante la inhibición de la enzima farnesil pirofosfato sintetasa y la consecuente inhibición de la prenilación post-transcripcional de pequeñas proteínas GTPasas como *ras*, *rac*, *rab* y *rho* (Dundford, 2001). Estas proteínas están involucradas en importantes procesos biológicos como el tráfico vesicular y el mantenimiento del citoesqueleto de las células.

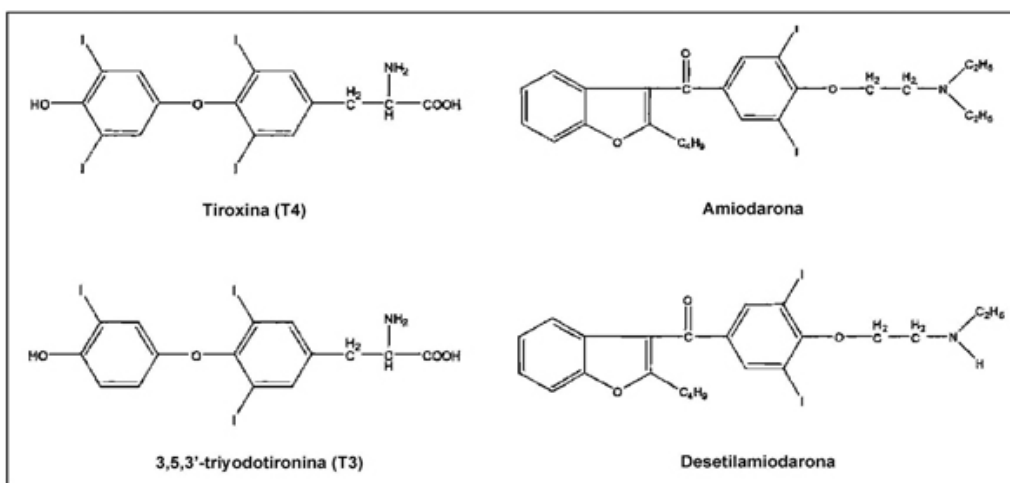
Desde hace algunos años, estos compuestos han despertado interés como potenciales agentes antiprotozoarios; esto debido a que pueden acumularse selectivamente dentro de ciertos organelos ácidos, ricos en calcio y pirofosfato. En tripanosomatideos, estos organelos son los acidocalcisomas; los cuales jugarían un papel similar al del hueso mineral, el cual presenta una alta afinidad en la unión de los bisfosfonatos. (Urbina, 1999; Docampo, 1999).

La bibliografía reporta hallazgos de que los bisfosfonatos son capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de parásitos como *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. donovani*, *T. gondii* y *P. falciparum* (Martin, 2001), sin causar daño sobre la célula hospedadora. El efecto de ciertos bisfosfonatos

como el risendronato sobre la biosíntesis de esteroides ha sido estudiado en *T. cruzi* ampliamente, tanto de forma individual como su efecto sinérgico con ketaconazol (Inhibidor de la enzima 14- $\alpha$ -desmetilasa). Cuando ambas drogas se usan en combinación, se aprecia una completa inhibición del crecimiento y lisis celular. Además hay una disminución de la cantidad de esteroides 14- $\alpha$ -desmetilados, mientras que no se detectó acumulación de productos aguas abajo de la ruta como el escualeno. Esto indica que los bisfoponatos actúan a nivel pre-escualeno en parásitos (Martin, 2001).

### 1.8.2 Amiodarona

La amiodarona ((2-butil-3-benzofuranil)[[4-[2-(dietilamino)ethoxi]]3,5diiodo.,fenilmetanona hidroclicrida)) es un potente antiarrítmico de clase III derivado del Benzofurano, que posee una estructura química parecida a la de las hormonas tiroideas T3 y T4 (Figura 5). Cada molécula de amiodarona contiene 2 átomos de yodo, lo que equivale al 37% de su peso molecular.



**Figura 5.** Estructura química de la Amiodarona y su similitud con las hormonas tiroideas T3 y T4.

El mecanismo de acción de la amiodarona no está completamente dilucidado, sin embargo se han descrito algunos de sus efectos. Según Rosembaun y col. (1976) la amiodarona es utilizada a nivel clínico ya que muestra efectos similares a los beta bloqueantes y bloqueadores de los canales de K<sup>+</sup> tanto sobre el nodo SA como el nodo AV, incrementa el período refractario mediante el efecto sobre las vías de los canales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, enlentece la conducción intracardíaca del

potencial de acción, por efecto sobre el canal de Na<sup>+</sup> y prolonga la fase 3 del potencial de acción cardíaco.

La administración de la amiodarona se realiza por vía oral o intravenosa; la absorción de esta droga es extremadamente lenta e incompleta en el tracto digestivo, siendo metabolizada en el hígado principalmente y en el lumen de la mucosa intestinal. Por su parte, la droga se distribuye ampliamente en el tejido adiposo, hígado, miocardio, pulmones, riñones, tiroides, piel y tejido pancreático, concentrándose en la saliva, bilis y el semen (<http://www.VADECUM.com>).

La amiodarona y la DEA (N-desetilamiodarona), principal metabolito, se eliminan bifásicamente, a través del hígado con una semi-vida de eliminación de 10 días en la primera fase, y una máxima entre 27 y 103 días, siendo su valor medio 53 días. Para la administración de la amiodarona, se ha establecido para niños dosis iniciales de 10 a 15 mg/kg de peso por día, hasta 600-800 mg/día; en adultos las dosis recomendadas varían entre 800-1600 mg/kg/día. Obteniéndose valores de 0.1 –10 µM amiodarona en las concentraciones plasmáticas luego de la administración terapéutica (Reader y col.,1985).

A pesar de sus bondades, la amiodarona presenta tanto ventajas como desventajas en su uso; así, su uso debe ser limitado pues alrededor de 70% de los pacientes tratados experimentan algún efecto secundario; no obstante, solo entre el 5% y 20% de estos pacientes se les recomienda suspender el tratamiento. Las reacciones adversas son acumulativas con lo cual estas reacciones aumentan con la dosis, presentándose principalmente con dosis iguales o superiores a 400 mg diarios, y en tratamientos superiores a 6 meses (<http://www.VADECUM.com>)

## 2. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

### 2.1 Crecimiento de *T. evansi* ``in vitro''.

Los cultivos de tripanosomatideos *in vitro* son modelos experimentales que han permitido grandes avances en la caracterización y descripción morfológica y química de parásitos (Duran y col. 2010). Han sido ampliamente utilizados debido a su bajo costo, a que permite sostener ensayos simultáneos y a que es relativamente sencillo de mantener. Aún así, en la actualidad existen muchos tipos celulares para los cuales no se ha encontrado el medio de cultivo adecuado. En el caso de *T. evansi* este modelo experimental ha sido muy poco desarrollado.

Baltz y col en 1985 son los primeros que proponen un modelo para cultivar en medios semi definidos formas infectivas de *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* y *T. gambiense*. En el medio que propuso, logró cultivar una cepa africana aislada de un camello en Kenia.

Zweygarth y Rottcher en 1986 también logran un cultivo exitoso de tres cepas africanas distintas de *Trypanosoma (trypanozoon) brucei evansi*, utilizando fibroblastoides como células alimentadoras. En esos años no estaban tan bien definidas las diferencias entre *T. brucei* y *T. evansi*, por ende es probable que las parásitos con los que Zweygarth trabajó fueran *T. brucei* y no *T. evansi*.

Por otro lado, en cuanto a aislados venezolanos de *T. evansi*, Sanabria (2011) obtuvo cultivos exitosos del aislado TEVA1 proveniente de caballos en el estado Apure utilizando una modificación del medio mínimo esencial (MEM) propuesto por Baltz y col. en 1985. Los cultivos se mantuvieron durante 96 horas.

### 2.2 El pamidronato y la amiodarona como tratamientos contra tripanosomatideos

En la búsqueda de nuevas alternativas quimioterapéuticas se han utilizado diversas drogas existentes en el mercado, las cuales han sido diseñadas para tratar ciertas patologías, intentando

con esto relacionar su acción como agentes tripanocidas y su posible relación con los procesos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este tiene un importante papel como regulador en los diferentes procesos intracelulares en células eucariotas y en algunos parásitos. En el caso particular de los tripanosomatídeos, éstos durante su ciclo de vida sufren cambios en el hábitat al pasar de un hospedador a otro (vertebrado a invertebrado), y además en algunos casos sufren cambios morfológicos y metabólicos.

La amiodarona ha demostrado actividad anti fúngica en hongos y levaduras (Courchesne, 2002). Este efecto parece ser mediado al menos en parte, por la disrupción de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  (Courchesne y Ozturk, 2003) y actúa en sinergia con inhibidores de la síntesis de ergosterol.

Por otro lado, Benaim y col. 2006, demostraron en ensayos con *Trypanosoma cruzi* que la amiodarona es capaz de causar disrupción del potencial de la membrana mitocondrial. Igualmente, los autores demostraron que el posaconazol (agente fungicida) y la amiodarona, pueden actuar de forma combinada, provocando cambios en la concentración de calcio intracelular en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Los resultados indican que la combinación de estas drogas, tiene un efecto sinérgico sobre la muerte de los parásitos, a través de la disrupción de la homeostasis intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En este mismo trabajo, Benaim y col. 2006, evaluando el posible efecto de la amiodarona y el posaconazol sobre los esteroides presentes en epimastigotes de *T. cruzi*, observaron una reducción del esteroide endógeno 14-desmetil y la acumulación de 14-metil (lanosterol y eburicol). Por otro lado, encontraron una reducción de los niveles de esteroides endógenos sin acumulación de esteroides intermediarios, lo que indica una inhibición de la síntesis “de novo” de esteroides a

nivel del lanosterol. Estos resultados muestran claramente, la acción de un fármaco comúnmente utilizado para tratar pacientes con arritmias cardíacas, teniendo actividad tripanocida ‘‘*in vitro*’’, al afectar la homeostasis intracelular del  $\text{Ca}^{+2}$  en *Trypanosoma cruzi*.

Resultados similares fueron obtenidos con *Leishmania mexicana* por Serrano y col. 2009 en el mismo laboratorio donde se desarrollaron los ensayos de los trabajos anteriormente mencionados. En este parásito la amiodarona también es capaz de inducir la rápida muerte del parásito, incluso en los estadios intracelulares (dentro de macrófagos infectados), siendo ésta la fase clínicamente relevante del parásito. De la misma forma como ocurre en *T. cruzi*, la muerte del parásito ocurre por la disrupción de la homeostasis intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$ , con la subsiguiente liberación del catión desde la mitocondria hacia el citoplasma, producida por la amiodarona.

Los resultados anteriores sugieren que la amiodarona podría ser efectiva para el tratamiento de enfermedades causadas por tripanosomatídeos. Es importante señalar que estos parásitos además de poseer una única mitocondria gigante, ésta contiene ergosterol a diferencia de la mitocondria del hospedador mamífero; lo que hace más interesante aún el uso de la amiodarona, ya que el blanco de acción es diferente al del hospedador.

### 2.3 Alteraciones ultraestructurales

A pesar de ser una epizootia que impacta duramente en la estructura socio-económica venezolana, son pocas las investigaciones disponibles acerca de las alteraciones ultraestructurales que ocasiona la tripanosomosis producida por *T. evansi* en nuestro país. En 1994, Quiñones-Mateu y col. describen el patrón ultraestructural de fibras musculares de caballos infectados naturalmente

con *T. evansi*. Posteriormente Finol y col. (2001) obtienen resultados similares, examinando la ultraestructura de músculo esquelético de ratones infectados experimentalmente. Entre sus resultados resaltan: atrofia de la fibra muscular, formación de vaculas autofágicas, degeneración mitocondrial e infiltrados con macrófagos y neutrófilos.

Rossi y col. (1999) encuentran alteraciones en las células de la corteza adrenal, modificaciones en la pared de los capilares y presencia de tripanosomas intravasculares estudiando la glándula adrenal de ratones infectados experimentalmente. Otras investigaciones más recientes describen las alteraciones ultraestructurales de riñón (Tejero y col., 2009a), hígado (Tejero y col., 2009b) y corazón (Tejero y col., 2010).

Perrone (2003) hace un gran aporte en el conocimiento de la biología del *T. evansi* Venezolano realizando una caracterización parasitológica, bioquímica, antigénica y molecular de ocho aislados provenientes de distintas regiones del país y de distintos hospedadores.

Por todo lo anteriormente expuesto y considerando que la tripanosomosis causada por *T. evansi* reviste según la organización mundial de epizootias gran importancia en términos socioeconómicos y sanitarios con repercusiones importantes en la economía sustentada en el comercio animal, el presente trabajo de investigación busca contribuir con los conocimientos acerca de un modelo experimental hasta ahora poco conocido de pruebas *in vitro* con los distintos aislados venezolanos de *T. evansi*, que permita avanzar en el conocimiento de la biología de este parásito con mayor rapidez y menor inversión económica. Igualmente, se busca contribuir en la evaluación de tratamientos alternativos contra esta epizootia.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del pamidronato y la amiodarona sobre aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi* utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 3.2.1 Establecer y mantener cultivos *in vitro* de aislados venezolanos de *T. evansi*
- 3.2.2 Evaluar el efecto del pamidronato y la amiodarona sobre el crecimiento *in vitro* de los aislados venezolanos de *T. evansi*.
- 3.2.3 Evaluar el efecto del pamidronato y la amiodarona sobre el crecimiento *in vivo* de los aislados venezolanos de *T. evansi*.
- 3.2.4 Determinar las diferencias morfométricas entre los aislados y en el tiempo, durante el tratamiento con pamidronato y amiodarona.
- 3.2.5 Describir las alteraciones ultraestructurales que experimentan los parásitos a lo largo del tratamiento con pamidronato y amiodarona.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Material Biológico:

**4.1.1 Parásitos:** Se utilizaron para el desarrollo de los ensayos los siguientes aislados de *Trypanosoma evansi*, provenientes originalmente de hospedadores naturales.

- TEVA1: Aislado en la región de La Sabana, Estado Apure. La muestra original fue obtenida de un *Equus caballus* infectado de forma natural.
- FRIO: Aislado en el hato El Frío, Estado Apure. La muestra original fue obtenida de un *Hydrochaeris hydrochaeris* infectado en forma natural.

Al momento del aislamiento de los hospedadores naturales, los parásitos fueron inoculados por vía intraperitoneal en ratas Sprague-Dawley para su expansión y posterior criopreservación en presencia de dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%. (Perrone y col. 2009). Los aislados han sido mantenidos en criopreservación hasta la fecha.

**4.1.2 Células:** Línea Celular Vero, correspondientes a células epiteliales de riñón de mono verde africano *Chlorocebus sp.* iniciada en 1962. Esta línea celular se mantiene activa en el laboratorio de Señalización celular y bioquímica de parásitos, en el Instituto de Estudios Avanzados IDEA.

**4.1.3 Ratones:** Para los ensayos *in vivo* fueron utilizados ratones de la cepa Balb-C, provenientes del bioterio del Instituto de Biomedicina; y mantenidos en el bioterio del Instituto de Estudios Avanzados IDEA.

### 4.2 Drogas para tratamientos

Los tratamientos quimioterapéuticos fueron aplicados con las siguientes drogas:

1. Pamidronato (Aminomux®, Leti).
2. Amiodarona((2-butyl-3-benzofuranil)[[4[2(diethylamino)ethoxy]]]3,5diiodofenil metanona hidrocliclorida)) SIGMA (St. Louis, MO).

### 4.3. Métodos

Para el desarrollo los objetivos planteados en el presente trabajo de investigación, la metodología se dividió de la siguiente manera:

- Establecimiento de cultivos *in vitro*
- Evaluación del efecto de las drogas en los cultivos *in vitro*
- Evaluación del efecto de las drogas *in vivo*
- Determinación de variables morfométricas
- Microscopía electrónica de transmisión

#### **4.3.1 Establecimiento de cultivos *in vitro***

4.3.1.1 Obtención de tripanosomas: Para la obtención de los parásitos a partir de sangre fresca infectada, se utilizó la técnica de purificación mediante el uso de intercambiadores iónicos, que se basa en las cargas iónicas diferenciales de los componentes sanguíneos y los tripanosomas (González y Perrone, 2003). Se utilizó la modificación del protocolo de Lanhan y Godfrey (1970) sugerida en 2003 por González y Perrone. Previo a la purificación se infectaron ratas con los aislados de *T. evansi*. Se inocularon intraperitonealmente con 0,1- 0,5 ml de sangre fresca o criopreservada y fueron sometidos a control y seguimiento interdiario para detectar la presencia de parásitos en la sangre periférica.

4.3.1.2 Preparación de la columna cromatográfica: La columna de plástico de 20 mL se colocó en sentido vertical sostenida con pinzas y un adaptador a un soporte universal. Posteriormente se resuspendieron en un beaker 6 gr de DEAE-Celulosa en 80 ml de PBS (Buffer fosfato salino) pH 8,0. Sin dejar que se perdiera la homogeneidad se llenó la columna en el procedimiento denominado “empaquetamiento”. Una vez que comenzó a empaquetarse, se colocó en la salida de la columna una manguera con llave para controlar la velocidad de goteo. Con una pipeta pasteur, se agregó PBS pH 8,0 para equilibrar las cargas de la columna hasta que el pH del líquido que sale de la columna por goteo “eluato” sea 8,0. Luego se lavó la columna con 5 volúmenes de PBSG a temperatura ambiente. Una vez que la columna estuvo lavada y el empaquetamiento fue

correcto (sin burbujas ni quiebres), la columna estuvo lista para la muestra. Todo este procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad.

4.3.1.3 Extracción de la sangre infectada: Al observarse parasitemias de aproximadamente  $10^6$ - $10^8$  tripanosomas/ml de sangre, los animales fueron debidamente anestesiados y sacrificados por punción cardíaca para la obtención de sangre. La sangre extraída se centrifugó a 700 G durante 10 min. Se descartó el plasma, evitando remover la interfase blanca que sedimenta sobre los eritrocitos; esta capa está constituida por leucocitos y tripanosomas. Luego se colectó la interfase blanca intentando recoger la menor cantidad posible de eritrocitos y se resuspendió lo colectado en una relación 1:3, sangre-PBSG. Ésta suspensión celular se lavó dos veces más con las condiciones de centrifugación descritas previamente.

4.3.1.4 Purificación de los Tripanosomas: Se agregó gota a gota el volumen de la suspensión de tripanosomas obtenida en el apartado anterior, a la columna de intercambio iónico. Se abrió la llave que permite el goteo, procurando un flujo lento, hasta observar la separación completa de la capa de parásitos y la capa de sangre. La salida de parásitos fue monitoreada por observación al microscopio de luz. El “eluito” fue colectado en tubos cónicos a 700 G durante 10 min. El sedimento obtenido se resuspendió en 2 ml de PBSG y se cuantificó el número de tripanosomas.

4.3.1.5 Cultivos de células VERO: La línea celular tipo fibroblasto VERO fue mantenida en cultivo en medio RMPI suplementados con Penicilina (100 U/ml)/ Estreptomina (100 µg/mL) y GlutaMAX™ 8mM, en frascos de cultivo de 25 ml, hasta su uso en los cultivos de parásitos. Una vez observada una confluencia celular del 70% aproximadamente, las células fueron despegadas del frasco de cultivo, resuspendidas en medio fresco y cuantificadas. Posteriormente fueron transferidas a placas de cultivo de 12 pozos, sembrando  $5 \times 10^4$  células/pozo/ml de medio. Se esperó tiempo suficiente para que las células se adhirieran a las placas y comenzaran a multiplicarse.

4.3.1.6 Cultivos *in vitro*: Los cultivos *in vitro* de *T. evansi* se llevaron a cabo con base en una modificación de los protocolos descritos por Baltz y col. 1985 y Zwegarth y Rottcher, 1986. Se prepararon seis medios de cultivo con modificaciones en su composición como se describe en la tabla 1; adicionalmente se utilizó PBSG como otro medio de cultivo que funcionó como un

control (ver composición en la tabla 1). Una vez purificados, los tripanosomas fueron colocados en placas de cultivo con cada uno de los medios descritos en la tabla 1. Cada experimento se realizó con células VERO y sin células VERO, por triplicado.

El DMEM, el medio Leibowitz y el medio RPMI, fueron preparados de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial y fueron suplementados con Penicilina (100 U/ml)/ Estreptomicina (100 µg/ml) y GlutaMAX™ 8mM.

**Tabla 1.** Composición de los medios de cultivo.

Medio	A	B	C	[mM]
<b>Composición</b>	Buffer Hepes			
	Sales de Earle con aa's no esenciales			
	D-glucosa			5,5
	Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )			8,9
	2-mercaptoetanol			0,2
	Suero fetal bovino 10%	Suero fetal equino 10%	Suero fetal equino 15%	
			Piruvato sódico	2
			Hipoxantina	0,1
			L-Glutamina	2

**Continuación Tabla 1.** Composición de los medios de cultivo.

Medio	D	E	F	[mM]
Composición	Medio Leibovitz L-15			
	Medio RPMI			
	Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )			8,9
	2-mercaptoetanol			0,2
	D-glucosa			5,5
	Suero fetal bovino 10%	Suero fetal equino 10%	Suero fetal equino 10%	
			Glicerol 5%	
Medio	PBSG			[mM]
Composición	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			95
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			5
	NaCl			73
	Glucosa 1%			

#### 4.3.2 Evaluación del efecto de las drogas en los cultivos *in vitro*

Una vez establecido el medio de cultivo donde los parásitos tuvieran una mayor sobrevivencia, se procedió a evaluar el efecto de las drogas sobre el crecimiento de los parásitos. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de cultivo de 12 pozos, colocando una cantidad de 10<sup>4</sup> parásitos/pozo, el diseño experimental de las placas se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Diseño experimental que se empleará para los cultivos *in vitro*.

Tratamientos en el medio de cultivo seleccionado				
Réplica 1	Control sin tratamiento	Pamidronato	Amiodarona	Pamid. + Amiod.
Réplica 2				
Réplica 3				

Las pruebas de drogas se realizaron en cultivos de una duración total de 120 horas por lo que las muestras para el conteo de la densidad parasitaria se tomaron a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas de cultivo. Los tratamientos fueron aplicados en una sola dosis a las 48 horas. Pruebas separadas fueron realizadas para el aislado TEVA1 y para el aislado FRIO.

### 4.3.3 Evaluación del efecto de las drogas *in vivo*

En esta fase, se realizaron infecciones experimentales en ratones con los aislados TEVA1 y FRIO de *T. evansi*, sobre las cuales se evaluaron los efectos de pamidronato y amiodarona.

4.3.3.1 Reactivación de los aislados de *T. evansi*: Ratas Sprague-Dawley fueron inoculadas intraperitonealmente con 0,5 ml de sangre criopreservada que contenía los aislados de *T. evansi* y fueron sometidas a control y seguimiento interdiario para detectar la presencia de parásitos en la sangre periférica. Una vez alcanzada una parasitemia de  $10^4$  parásitos/ml de sangre, fue extraída la sangre de los animales por punción cardíaca.

4.3.3.2 Inóculo de ratones con aislados de *T. evansi*: Ratones BalbC fueron inoculados con la sangre contentiva de parásitos, a razón de 10 tripanosomas/gr de peso ratón (Tejero y col, 2008).

4.3.3.3 Tratamientos: El pamidronato se administró a razón de 10mg/Kg durante 7 días comenzando 1 día post-infección utilizando agua destilada como vehículo (Urbina y col. 1999). La amiodarona se administró a razón de 25mg/Kg utilizando PBSG como vehículo (Serrano y col. 2009b). Se evaluó diariamente la parasitemia, el peso y la sobrevivencia de los animales.

Tabla 3. Esquema del diseño experimental que se empleará para las infecciones de ratones con *T. evansi*.

Aislado	Control	Control Infeccion	Control Pamidronato	Control Amiodarona	Control Pam. + Amio.	Infectado Pamidronato	Infectado Amiodarona	Infect. Pam + Amio
TEVA 1	6 ratones para cada grupo							
FRIO								

### 4.3.4 Determinación de variables morfométricas

Para cuantificar las variables morfométricas, se tomaron 5  $\mu$ l de sangre y se extendieron a lo largo de un portaobjetos utilizando otro portaobjetos guardando un ángulo de

aproximadamente 45° entre ellos y procurando un solo movimiento. Estos extendidos, fueron coloreados de acuerdo al protocolo rutinario de coloración GIEMSA que se describe a continuación:

Cubrir con metanol absoluto (20µl, 5 min).

Secar al aire.

Cubrir con Giemsa (10% en agua corriente, 20min).

Ecurrir el Giemsa.

Sumergir en acetona para eliminar el exceso de Giemsa.

Ecurrir y secar al aire.

A partir de estos extendidos se delinearon 30 de los tripomastigotes presentes para cada grupo experimental, los dibujos fueron digitalizados y posteriormente se estimaron, con el programa ImageTool, las magnitudes numéricas de la longitud total (L) y el ancho máximo a nivel del núcleo (A).

#### **4.3.5 Microscopía electrónica de transmisión**

Para la microscopía electrónica de transmisión fueron procesadas tres muestras sanguíneas de cada grupo experimental, empleando la metodología rutinaria que se describe a continuación:

##### 4.3.5.1 Fijación:

Como primer fijador se empleó el glutaraldehído al 3% en buffer fosfato de Millonig (1961), siendo el pH de 7,4 y la osmolaridad 320 mOsm, (Bozzola y Russell, 1992).

Las muestras fueron fijadas durante 45 minutos. Al cabo de ese tiempo, se lavaron en buffer fosfato por 5 minutos y se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1% en el mismo buffer y bajo las mismas condiciones de osmolaridad y pH. La postfijación se prolongó durante 1 hora, prosiguiendo con un lavado de 15 minutos en agua destilada.



4.3.5.2 Deshidratación: Se utilizó etanol como agente deshidratante, siguiendo el protocolo:

Etanol al 50% en agua.....2 cambios (5min/cambio).  
Etanol al 60% en agua.....1 cambio (5min).  
Etanol al 80% en agua.....1 cambio (5min).  
Etanol al 95% en agua.....1 cambios (5min).  
Etanol al 100%.....2 cambios (5min/cambio).

La deshidratación hasta el etanol de 80% se llevó a cabo a una temperatura de 4° C. Los pasos posteriores fueron realizados a temperatura ambiente.

4.3.5.3 Infiltración: Los pasos son:

Óxido de propileno.....2 cambios (15min/cambio).  
Óxido de propileno-epón (1:1).....1 cambio (30min).

Posteriormente, se sacó la muestra del óxido de propileno y se introdujo en un recipiente que contiene la resina epóxica.

4.3.5.4 Inclusión: La inclusión de la muestra en un soporte sólido permite obtener cortes finos. Antes de la inclusión, se efectuaron 4 cambios en resina de 30 minutos cada uno (Luft, 1961). La resina consta de los siguientes componentes:

EM bed – 812..... 9,0 ml  
DDSA..... 6,0 ml  
NMA.....5,0 ml  
DMP–30.....0,5 ml

La inclusión se llevó a cabo por 48 horas a 60°C.

4.3.5.5 Corte y contraste: Los cortes ultrafinos (60–90 nm) fueron obtenidos con cuchilla de diamante acoplada a un ultramicrotomo Porter–Blum MT2–B. Las secciones finas se contrastaron con acetato de uranilo (Watson, 1958) y citrato de plomo (Reynolds, 1963).

El acetato de uranilo se usó en forma de solución acuosa al 3%. La rejilla se colocó por 35 minutos sobre la superficie de la solución de acetato de uranilo en oscuridad, luego se hizo un lavado con agua destilada y se dejó secar antes de proceder al tratamiento con el siguiente compuesto.

El contraste con citrato de plomo se efectuó colocando una gota de la solución sobre papel “parafilm” en una placa de Petri. Es importante destacar que, para este momento, la placa debía encontrarse completamente anhidra, por ello, se le colocaron perlas de NaOH durante los 20 minutos previos a la introducción de las rejillas. Luego de 15 minutos en contacto con el contrastante, los cortes se enjuagaron vigorosamente con agua destilada y se dejaron secar.

4.3.5.6 Observación: Los cortes se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011, con voltaje de aceleración de 80 kV. El registro permanente se efectuó en negativos de 8,3×10,2 cm.

#### **4.3.6 Análisis estadístico de los resultados**

El ANOVA es un procedimiento estadístico que permite analizar si un conjunto de grupos difieren significativamente entre sí, en cuanto a sus medidas aritméticas. Mediante la comparación, se pretende probar la hipotética diferencia entre más de dos grupos. (Sokal y Rohlf, 1981)

En el presente trabajo de investigación el ANOVA es la herramienta con la cual se analizaron las diferencias entre los aislados TEVA1 y FRIO de *T. evansi* a raíz de los tratamientos con pamidronato y amiodarona durante el desarrollo de los cultivos *in vitro* y las infecciones experimentales en modelos murinos.

## 5. RESULTADOS

En esta sección, se presentan los resultados obtenidos, que estarán organizados en dos grupos: en primer lugar los ensayos *in vitro*, en donde se mostrarán los esfuerzos por estandarizar un medio de cultivo exitoso para *T. evansi* y posteriormente, se muestran los ensayos del efecto de drogas en uno de los medios de cultivo, con pamidronato, amiodarona y la combinación de ambos tratamientos sobre los aislados TEVA1 y FRIO de *T. evansi*. El segundo grupo de resultados tiene que ver con la evaluación del efecto de pamidronato y amiodarona *in vivo*, empleando un modelo murino; los resultados están presentados desde un enfoque parasitológico, evaluando la parasitemia, sobrevivida y peso; desde un enfoque morfométrico, evaluando variaciones dimensionales de estos parásitos a lo largo del cultivo; y desde un enfoque ultraestructural, al evaluar cómo se ven afectados los parásitos a nivel subcelular por la acción de los tratamientos.

### 5.1 Establecimiento de los cultivos de *T. evansi*.

A fin de encontrar un medio de cultivo adecuado para el mantenimiento de *T. evansi* en condiciones *in vitro*, se llevaron a cabo ensayos con 13 medios de cultivo diferentes: PBSG con células vero y sin ellas, 5 diferentes combinaciones de DMEM y 6 medios con base en el RPMI. Para cada medio fueron utilizadas 3 réplicas, y en cada uno de ellos fueron probados por separado los aislados TEVA1 y FRIO, obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla 4.** Resultados de las pruebas para cultivos *in vitro* de *T. evansi*, utilizando Buffer Fosfato Salino Glucosado (PBSG) como medio de cultivo. El símbolo “-“ indica ausencia de parásitos en el medio, el símbolo “+” indica una baja abundancia de parásitos en cultivo ( $10^4 - 10^5$  parásitos/mL), el símbolo “++” indica media abundancia ( $10^6 - 10^7$  parásitos/mL) y el símbolo “+++” indica alta abundancia ( $10^8$  o más parásitos por mL)

Composición general del medio de cultivo		Aislado TEVA 1		Aislado FRIO	
		Duración del cultivo (días)	Abundancia de parásitos	Duración del cultivo (días)	Abundancia de parásitos
PBSG		1/2	+	1	+
	+ Células Vero	1	+	1	+

La tabla 4, muestra como en los ensayos en los que se utilizó PBSG como medio de cultivo, los parásitos sobrevivieron por muy poco tiempo y no fue apreciable ningún incremento poblacional.

**Tabla 5.** Resultados de las pruebas para cultivos *in vitro* de *T. evansi*, utilizando medio DMEM. El símbolo “-“ indica ausencia de parásitos en el medio, el símbolo “+” indica una baja abundancia de parásitos en cultivo ( $10^4 - 10^5$  parásitos/mL), el símbolo “++” indica media abundancia ( $10^6 - 10^7$  parásitos/mL) y el símbolo “+++” indica alta abundancia ( $10^8$  o más parásitos por mL)

Composición general del medio de cultivo		Aislado TEVA 1		Aislado FRIO	
		Duración del cultivo (días)	Abundancia de parásitos	Duración del cultivo (días)	Abundancia de parásitos
DMEM	+ SFB	-	-	-	-
	+ SFB + Células Vero	-	-	-	-
	+ SFH	-	-	-	-
	+ SFH + Células Vero	-	-	-	-
	Modificado	3-4	+++	-	-

Por otro lado, como se observa en la tabla 5, los medios DMEM con suero fetal bovino y DMEM con suero fetal equino (medios A y B, tabla 1), mostraron no ser los más adecuados para el crecimiento de ambos aislados. En contraste con esto, cuando fue empleado el medio DMEM modificado (medio C en la tabla 1), los parásitos del aislado TEVA1 se mantuvieron vivos durante 3 días mientras que con los parásitos del aislado FRIO no se observó crecimiento ni sobrevivencia por tiempo prolongado de los parásitos.

**Tabla 6.** Resultados de las pruebas para cultivos *in vitro* de *T. evansi*, utilizando medio RPMI. El símbolo “-“ indica ausencia de parásitos en el medio, el símbolo “+” indica una baja abundancia de parásitos en cultivo ( $10^4 - 10^5$  parásitos/mL), el símbolo “++” indica media abundancia ( $10^6 - 10^7$  parásitos/mL) y el símbolo “+++” indica alta abundancia ( $10^8$  o más parásitos por mL)

Composición general del medio de cultivo		Aislado TEVA 1		Aislado FRIO	
		Duración del cultivo (días)	Abundancia de parásitos	Duración del cultivo (días)	Abundancia de parásitos
RPMI	+ SFB	1	++	1	+
	+ SFB + Células Vero	1	+++	1	++
	+ SFH	1	+	2	+
	+ SFH + Células Vero	3-4	+++	2	++
	+ SFH + Glicerol	1	+	2	++
	+ SFH + Células Vero + Glicerol	3-4	+++	3-5	+++

Finalmente en la tabla 6, se evidencia que el medio RPMI, suplementado con suero fetal de caballo (medio F, tabla 1), mostro ser más efectivo en cuanto a la sobrevivencia de los parásitos

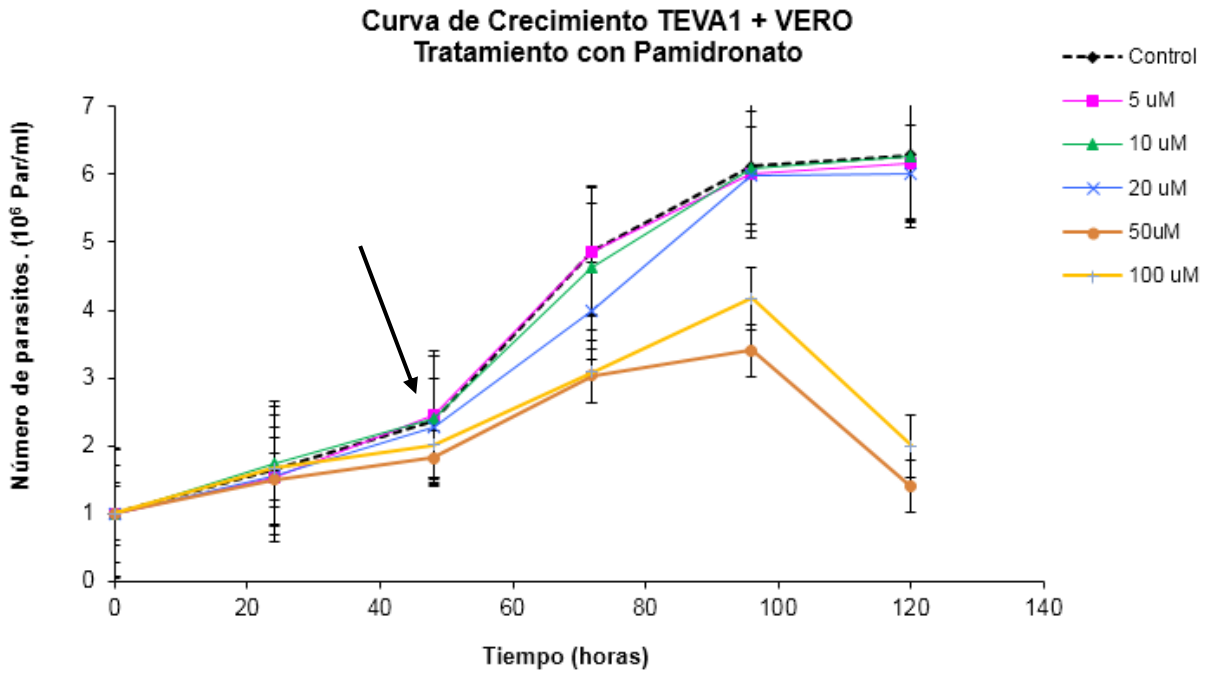
en comparación con los otros medios, tanto para el aislado virulento, como para el aislado con comportamiento crónico.

Por otro lado, al evaluar el crecimiento de los parásitos *in vitro* en presencia de células VERO como células promotoras de crecimiento o alimentadoras, se observaron diferencias en la abundancia de parásitos y la formación de rosetas o agregados de sobre la monocapa celular. A pesar de que los parásitos fueron resuspendidos para cuantificarlos, las rosetas se mantenían adheridas a las células, por lo que el número real de parásitos era mayor que el cuantificado.

## **5.2 Efectos del pamidronato y la amiodarona en la sobrevivencia de *T. evansi* *in vitro*.**

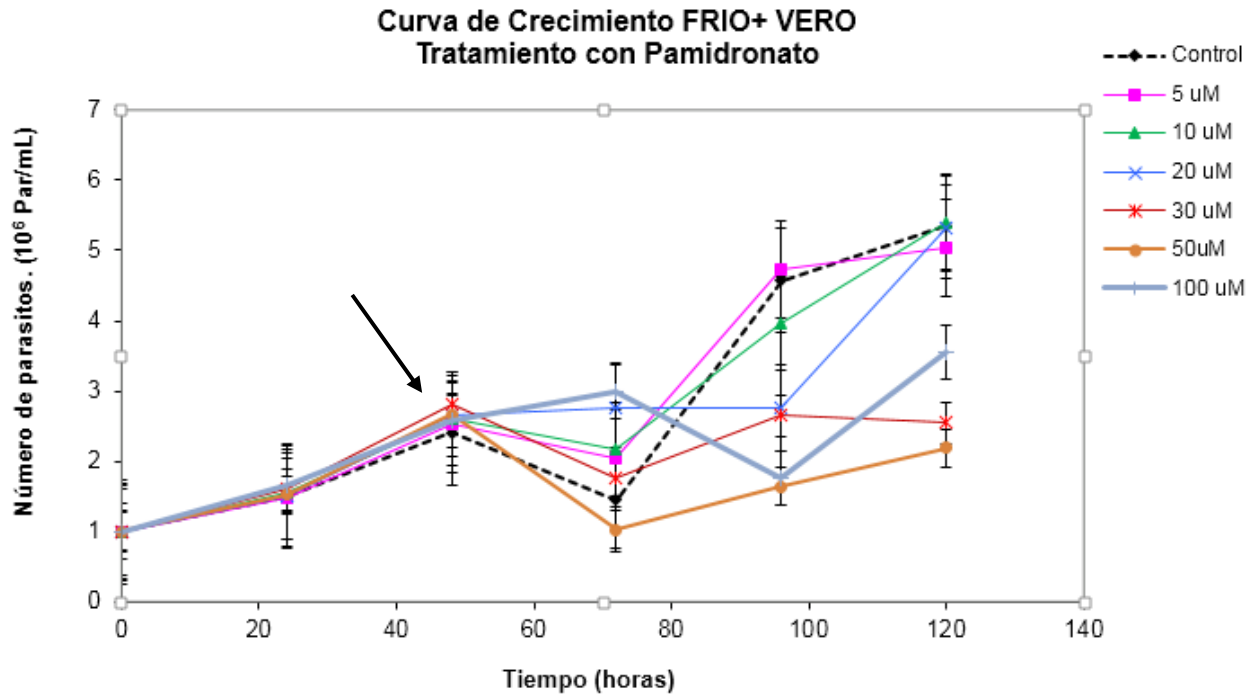
Para determinar los efectos del pamidronato y la amiodarona sobre los cultivos *in vitro* de *T. evansi*, se cuantificó la población de parásitos en los cultivos desde 0 hasta 120 horas utilizando diferentes concentraciones de éstas drogas y empleando el medio RPMI + SFH + células VERO + glicerol, que en la primera sección de nuestro trabajo demostró tener los mejores resultados.

### 5.2.1 Efectos del pamidronato sobre la sobrevivencia de *T. evansi* *in vitro*



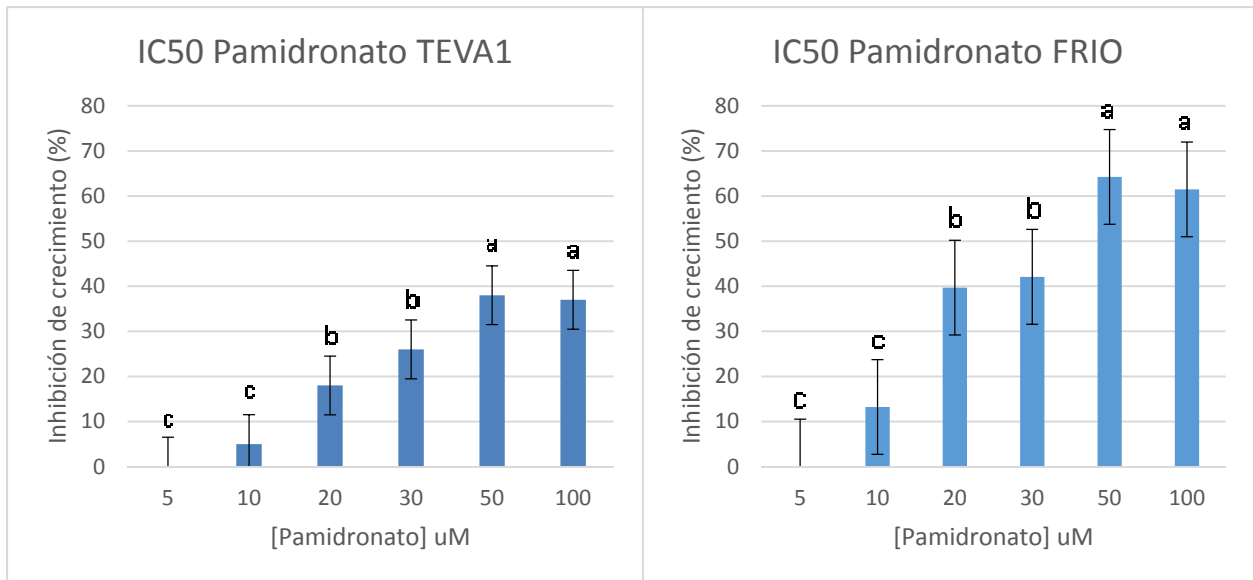
**Figura 6.** Efecto del pamidronato sobre el crecimiento del aislado TEVA1 de *T. evansi* durante 120 horas de cultivo *in vitro*, a concentraciones de 5, 10, 20, 30, 50 y 100 uM. Los puntos indican el promedio y las barras, el error estándar asociado a cada tratamiento. La flecha señala el punto en que fue aplicado el tratamiento (48 horas) lo cual implica 72 horas de exposición de los parásitos a los tratamientos.

En la figura 6 puede apreciarse como a medida que se aumenta la concentración de pamidronato disminuye la concentración de parásitos del aislado TEVA1 en el cultivo *in vitro*. Se observa que las tres primeras concentraciones (5, 10 y 20 uM) tienen un efecto muy similar al del grupo control (sin tratamiento) sobre la población parasitaria, empleando 30 uM de pamidronato es notable una disminución de la población a las 120 horas y al utilizar 50 y 100 uM de pamidronato se aprecia una disminución de la concentración de parásitos desde las 72 horas con respecto al grupo control sin tratamiento.



**Figura 7.** Efecto del pamidronato sobre el crecimiento del aislado FRIO de *T. evansi* durante 120 horas de cultivo *in vitro*, a concentraciones de 5, 10, 20, 30, 50 y 100 uM. Los puntos indican el promedio y las barras, el error estándar asociado a cada tratamiento. La flecha señala el punto en que fue aplicado el tratamiento (48 horas) lo cual implica 72 horas de exposición de los parásitos a los tratamientos.

En el caso del aislado FRIO, se aprecia en la figura 7 un comportamiento similar al de TEVA1 hasta las 48 horas, en el que hay un aumento progresivo de la población parasitaria. Luego de la adición del tratamiento, el comportamiento se aprecia más heterogéneo y a las 96 horas puede observarse como, a medida que aumenta la concentración de pamidronato, disminuye la población de parásitos en el cultivo, tendencia que se mantiene hasta las 120 horas.

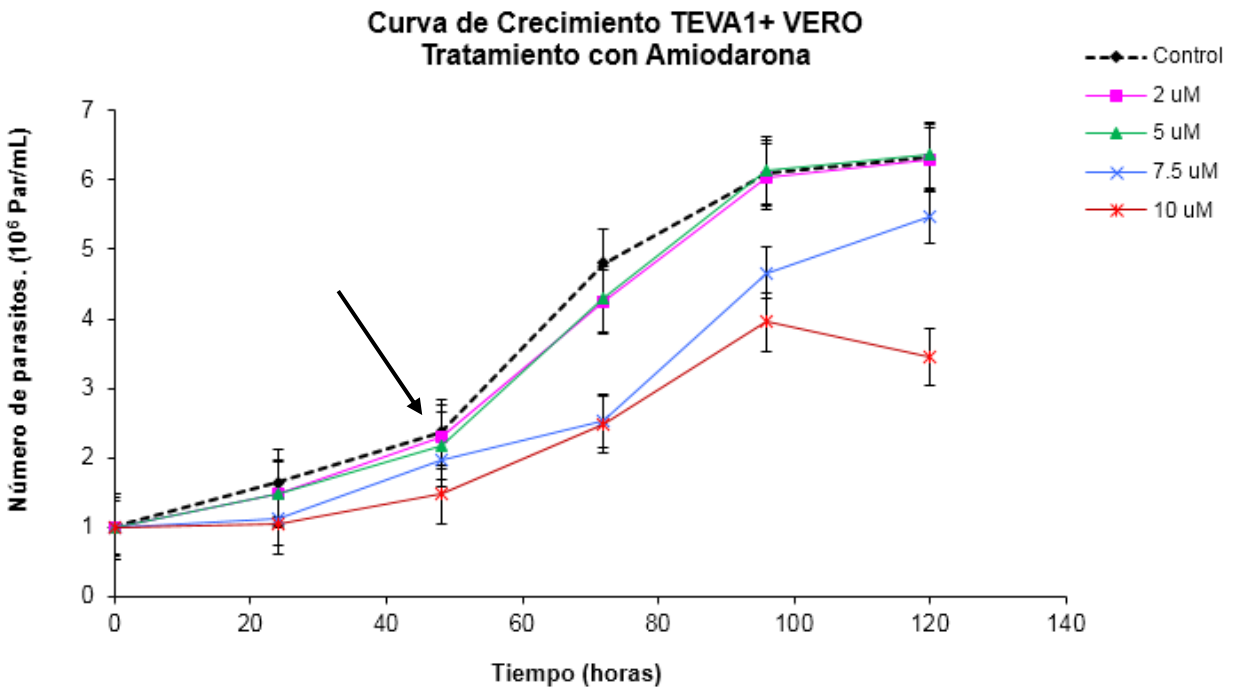


**Figura 8.** Curva dosis – respuesta para el pamidronato sobre un cultivo *in vitro* de los aislados TEVA1 y FRIO de *T. evansi*. La gráfica representa el promedio en cada punto y las barras indican el error estándar asociado a cada tratamiento. Las letras indican los grupos estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) con una prueba a posteriori de diferencia mínima significativa (MSD) luego de un análisis de varianza ( $\alpha = 0.05$ )

La figura 8 muestra la curva dosis-respuesta para pamidronato. Como se observa, sólo se alcanza un 40% de inhibición para el aislado TEVA1, aun con una alta concentración de la droga, sin embargo, para el aislado FRIO, las mismas concentraciones son suficientes para alcanzar un poco más de 60% de inhibición. En general los resultados muestran un efecto dosis dependiente, obteniéndose un IC50 de **180.085 uM** para el pamidronato sobre el aislado TEVA1 y un IC50 de **41.068 uM** para el pamidronato sobre el aislado FRIO.

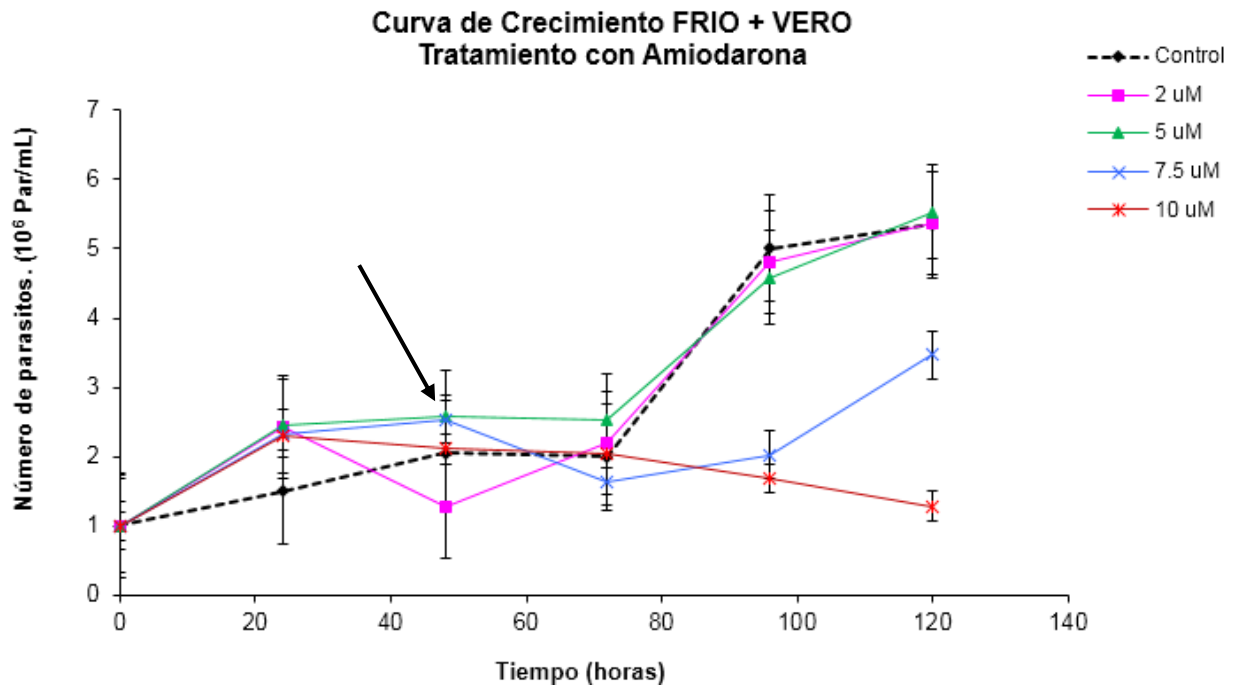


### 5.2.2 Efectos de la amiodarona sobre la sobrevivencia de *T. evansi* *in vitro*



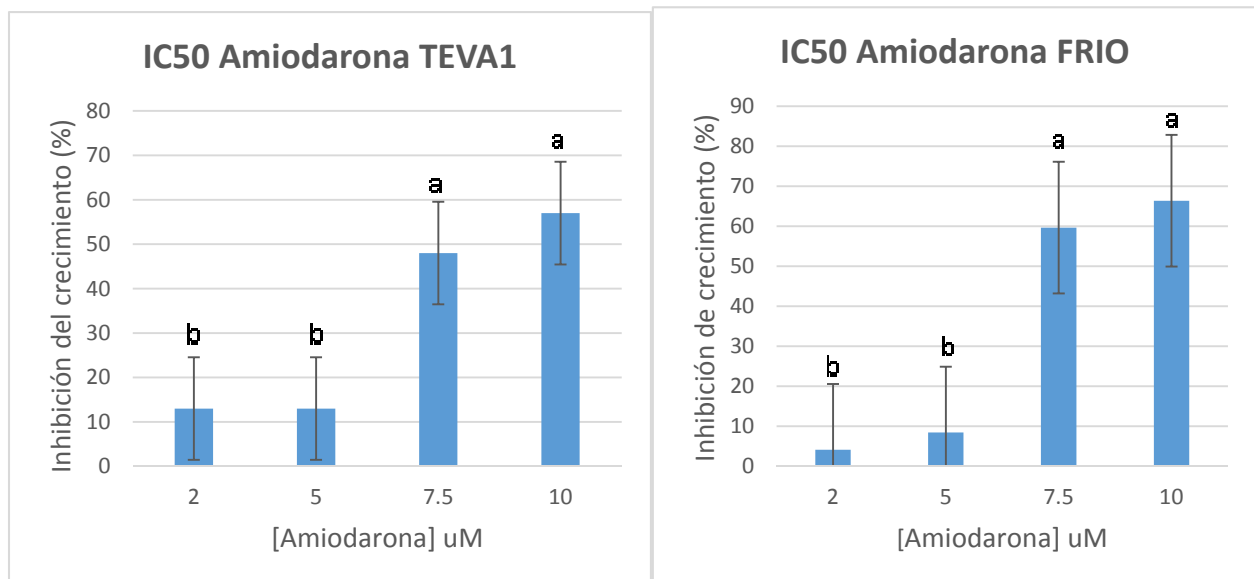
**Figura 9.** Efecto de la amiodarona sobre el crecimiento del aislado TEVA1 de *T. evansi* durante 120 horas de cultivo *in vitro*, a concentraciones de 2, 5, 7.5 y 10uM. Los puntos indican el promedio y las barras, el error estándar asociado a cada tratamiento. La flecha señala el punto en que fue aplicado el tratamiento (48 horas) lo cual implica 72 horas de exposición de los parásitos a los tratamientos.

Para la amiodarona sobre el aislado TEVA1, puede apreciarse que a lo largo de las 120 horas no hay una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los tratamientos con 2 y 5 uM de amiodarona, diferencia ( $p < 0.05$ ) que si se evidencia para las concentraciones de 7.5 y 10 uM.



**Figura 10.** Efecto de la amiodarona sobre el crecimiento del aislado FRIO de *T. evansi* durante 120 horas de cultivo *in vitro*, a concentraciones de 2, 5, 7.5 y 10 uM. Los puntos indican el promedio y las barras, el error estándar asociado a cada tratamiento. La flecha señala el punto en que fue aplicado el tratamiento (48 horas) lo cual implica 72 horas de exposición de los parásitos a los tratamientos.

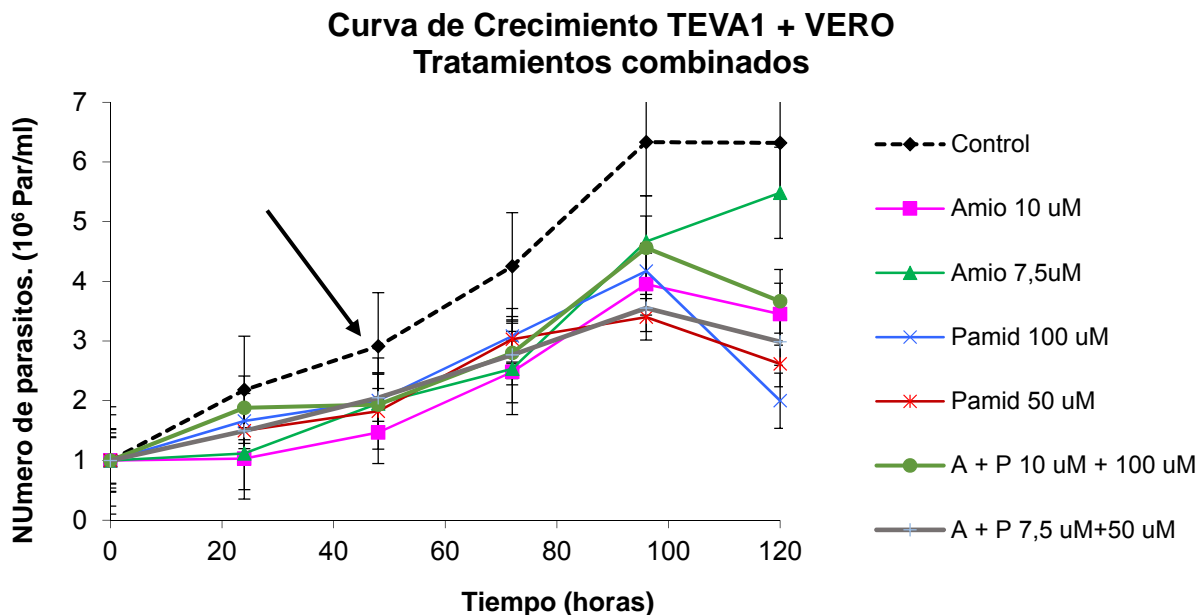
En el caso del aislado FRIO la tendencia es similar, como se muestra en la figura 10. Luego de las 72 horas las concentraciones de 7.5 y 10 uM propician una disminución de la concentración parasitaria en contraste con el grupo control.



**Figura 11.** Curva dosis – respuesta para la amiodarona sobre un cultivo *in vitro* con los aislados TEVA1 y FRIO de *T. evansi*. La gráfica representa el promedio en cada punto y las barras indican el error estándar asociado a cada tratamiento. Las letras indican los grupos estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) con una prueba a posteriori de diferencia mínima significativa (MSD) luego de un análisis de varianza ( $\alpha = 0.05$ )

La figura 11 muestra la curva dosis - respuesta para amiodarona, se observa que a concentraciones bajas de 2 y 5 uM se obtiene una inhibición por debajo del 12 % mientras que con las concentraciones mayores de 7.5 y 10 uM se alcanza cerca de 50% de inhibición para el aislado TEVA1 mientras que para el aislado FRIO se alcanza hasta un 66% de inhibición de la población celular. En general se observa un efecto dosis dependiente obteniéndose un IC50 de **11.546 uM** para la amiodarona sobre el aislado TEVA1 y un IC50 de **7.629 uM** para la amiodarona sobre el aislado FRIO.

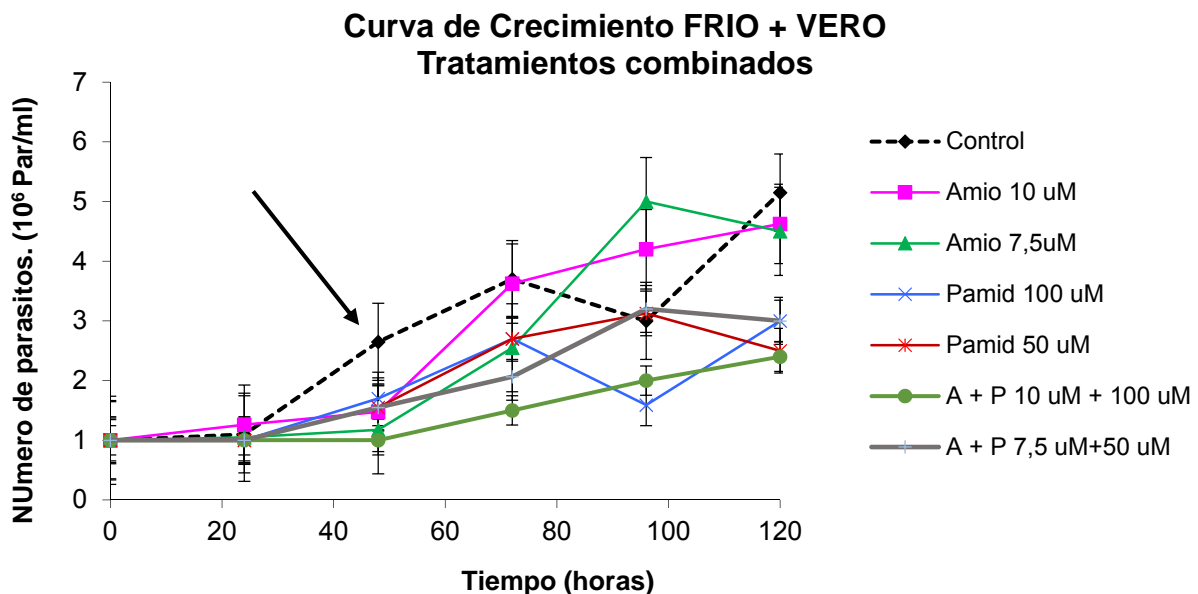
### 5.2.3 Efectos del tratamiento combinado de pamidronato y amiodarona sobre la sobrevivencia de *T. evansi in vitro*



**Figura 12.** Efecto combinado del pamidronato y la amiodarona sobre el crecimiento del aislado TEVA1 de *T. evansi* durante 120 horas de cultivo *in vitro*. Los puntos indican el promedio y las barras, el error estándar

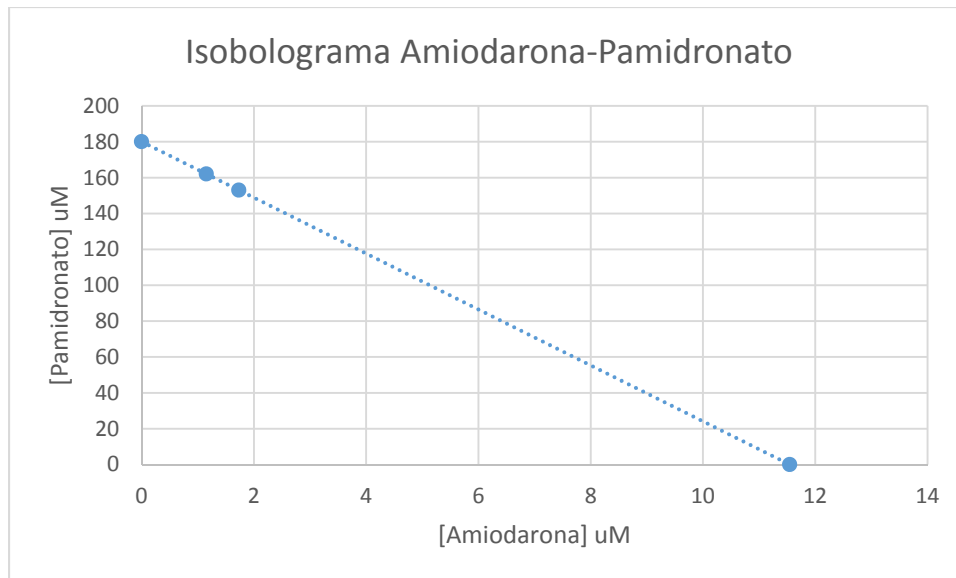
asociado a cada tratamiento. La flecha señala el punto en que fue aplicado el tratamiento (48 horas) lo cual implica 72 horas de exposición de los parásitos a los tratamientos.

La combinación de pamidronato y amiodarona sobre los dos aislados se probó a las concentraciones mínimas inhibitorias (7.5 uM amiodarona y 50 uM pamidronato) y a una concentración por encima de éstas (10 uM amiodarona y 100 uM pamidronato). Los resultados muestran como para el aislado TEVA1 la combinación a ambas concentraciones tiene un efecto de disminución del crecimiento en comparación con el grupo control y este efecto es consistente cuando se prueban ambas concentraciones por separado (Figura 12).



**Figura 13.** Efecto combinado del pamidronato y la amiodarona sobre el crecimiento del aislado FRIO de *T. evansi* durante 120 horas de cultivo *in vitro*. Los puntos indican el promedio y las barras, el error estándar asociado a cada tratamiento. La flecha señala el punto en que fue aplicado el tratamiento (48 horas) lo cual implica 72 horas de exposición de los parásitos a los tratamientos.

Un resultado similar se obtiene para el aislado FRIO como se muestra en la figura 13. Puede apreciarse la misma disminución en la velocidad de crecimiento, con la particularidad de que este aislado siempre muestra ondas de crecimiento más variables. Este comportamiento es consistente con los resultados obtenidos en los primeros experimentos *in vitro* (figuras 7 y 10).



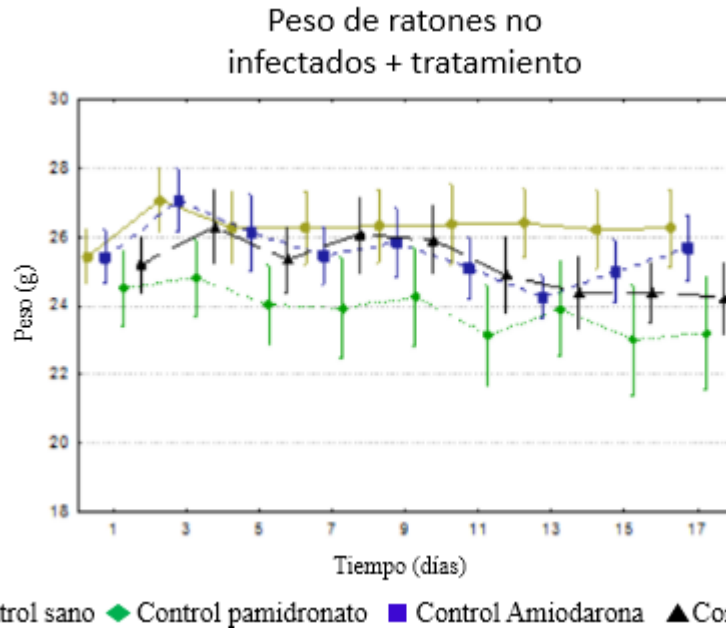
**Figura 14.** Isobolograma que describe el efecto aditivo de amiodarona y pamidronato sobre un cultivo *in vitro* de *T. evansi* durante 120 horas de tratamiento. Concentraciones mínimas y máximas fueron probadas solas y combinadas. Este isobolograma fue construido según las bases farmacocinéticas de las interacciones farmacológicas de Urizar (2005)

La figura 14 muestra un Isobolograma de la posible interacción del efecto del pamidronato y la amiodarona. Esta gráfica permite determinar si las drogas son capaces de interactuar sinérgicamente y potenciar su efecto cuando son empleadas en combinación, o por el contrario tienen un efecto antagonístico. Los resultados muestran en el modelo *in vitro* para *T. evansi*, que la combinación del pamidronato y la amiodarona, tiene un efecto aditivo, es decir no existe entre ellos una sinergia o verdadera interacción que potencie su efecto ni un antagonismo que propicie un efecto menor que cuando son empleadas por separado. Es importante resaltar que los resultados para ambos aislados (TEVA1 y FRIO) fueron exactamente los mismos.

### **5.3 Efectos del pamidronato y la amiodarona sobre la infección producida por *T. evansi* en ratones.**

Se llevaron a cabo los experimentos *in vivo*, utilizando un modelo animal susceptible a *T. evansi* con el fin de reproducir la infección parasitaria, incorporando así al experimento, elementos involucrados en la interacción fármaco-parásito-hospedador para evaluar el progreso de la

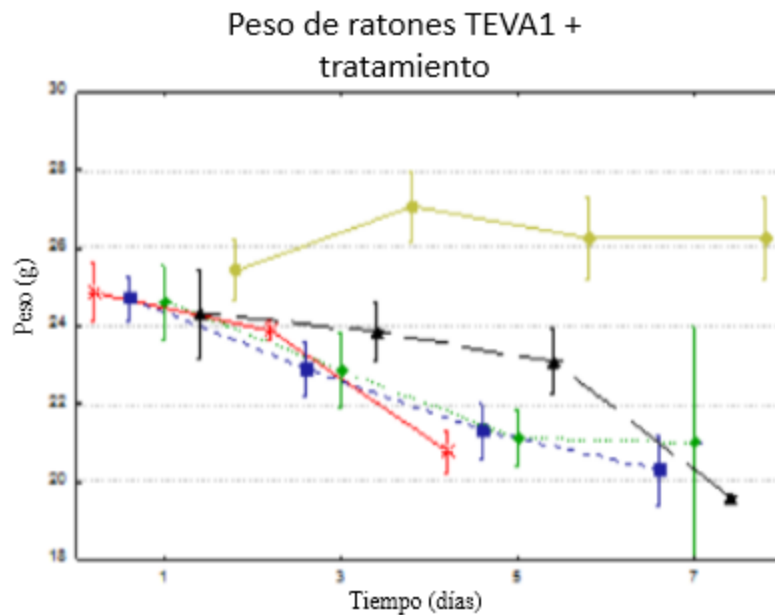
infección y el efecto de los tratamientos sobre ésta. Las variables tomadas en cuenta fueron: parasitemia, peso corporal, y sobrevivencia de los animales.



**Figura 15.** Variación del peso de los grupos control. Las líneas representan el curso promedio inter diario del peso, cada punto corresponde a la media aritmética de las réplicas utilizadas y las barras representan su error estándar asociado.

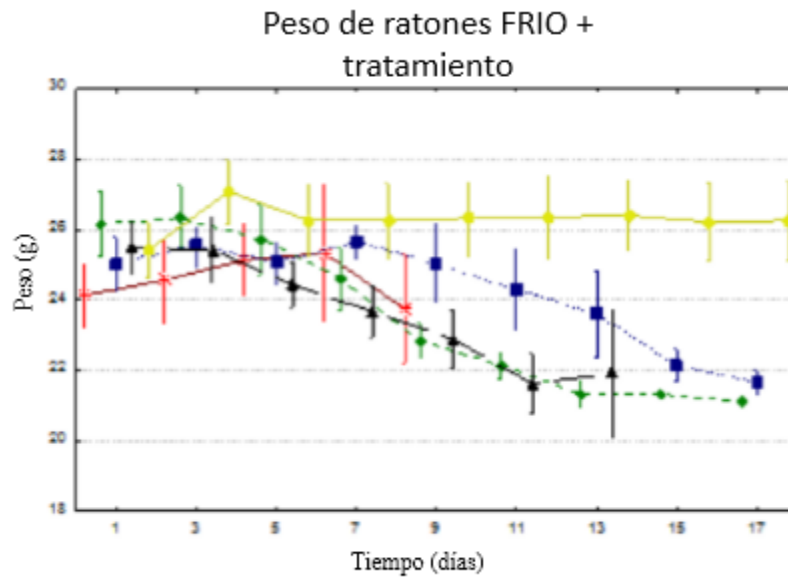
Para el estudio de esta variable, se hizo una comparación de la variación de peso de los controles no infectados que recibieron tratamientos con pamidronato y amiodarona. La figura 15 muestra como los pesos de los ratones control con amiodarona, en general se mantienen constantes, con leves fluctuaciones alrededor de un mismo peso. Por otra parte, el grupo control tratado con pamidronato y el grupo tratado con pamidronato + amiodarona, mostraron disminución de peso lenta y progresiva a lo largo de la infección.

La figura 16 muestra la variación de peso de los ratones infectados con el aislado TEVA1. Se observa que con todos los tratamientos hubo una pérdida de peso progresiva, es importante resaltar que el grupo control infectado que no recibió tratamiento presentó la pérdida de peso más vertiginosa.



● Control sano \* Control infección ◆ Pamidronato ■ Amiodarona ▲ Pam+Amiod  
**Figura 16.** Variación del peso de los ratones a lo largo de la infección experimental con el aislado TEVA1. Las líneas representan el curso promedio interdiario del peso, cada punto corresponde a la media aritmética de las réplicas utilizadas y las barras representan su error estándar asociado.

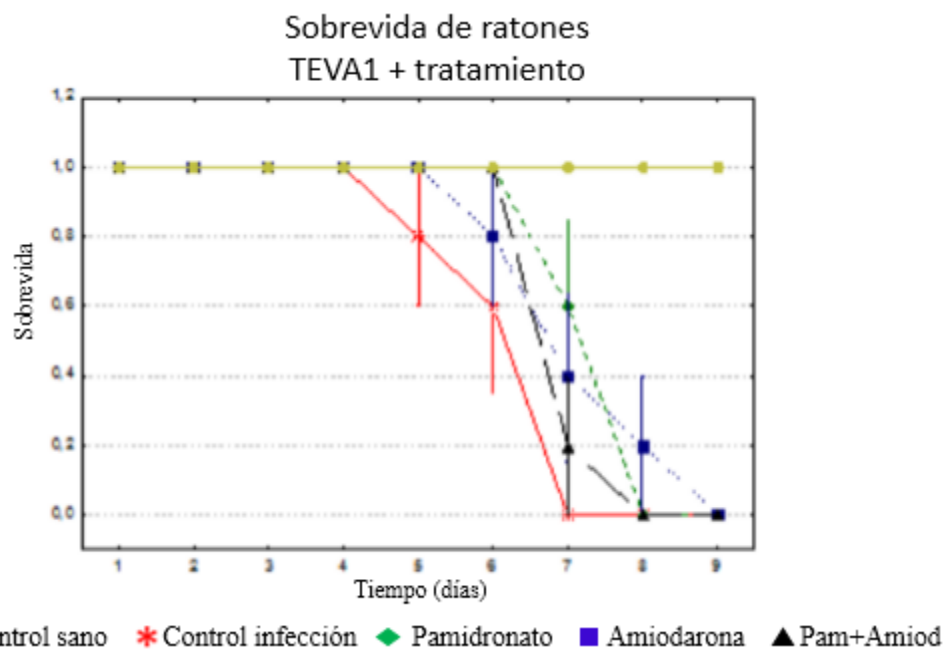
En las infecciones con el aislado FRIO, figura 17, el grupo tratado con pamidronato mostro disminución de peso desde el primer día de tratamiento, mientras que los grupos control infección y tratado con amiodarona mantuvieron el peso estable hasta el día 7, y luego comenzó la progresiva disminución hasta la muerte de los animales



● Control sano \* Control infección ◆ Pamidronato ■ Amiodarona ▲ Pam+Amiod  
**Figura 17.** Variación del peso de los ratones a lo largo de la infección experimental con el aislado FRIO. Las líneas representan el curso promedio interdiario del peso, cada punto corresponde a la media aritmética de las réplicas utilizadas y las barras representan su error estándar asociado.

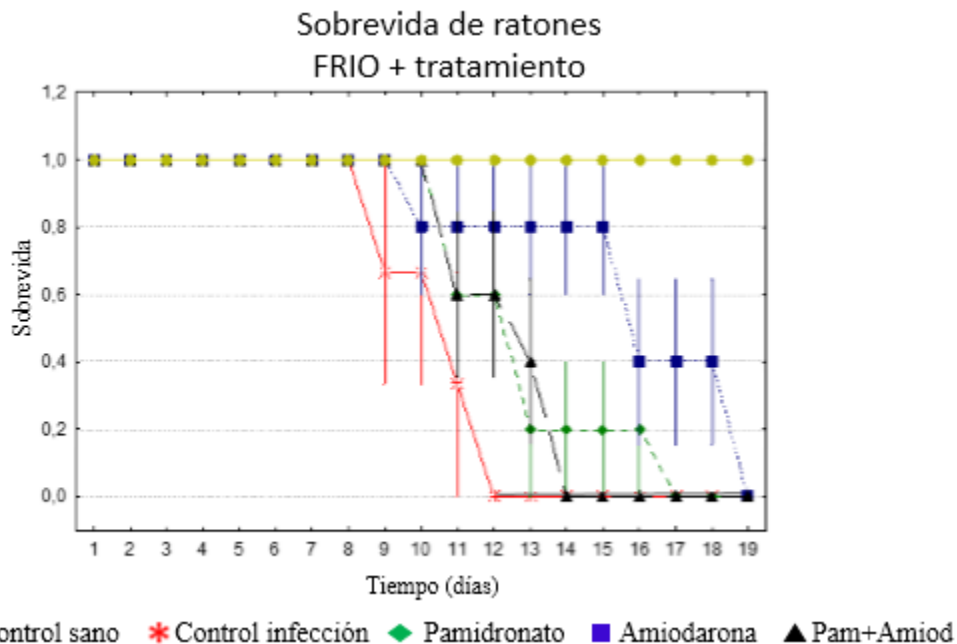
En las infecciones causadas por *T. evansi* existen otros parámetros cualitativos que proporcionan información relevante acerca de la evolución de la enfermedad en el hospedador vertebrado. A lo largo de la infección experimental los ratones experimentaron cambios en el comportamiento, incremento de la agresividad y la ansiedad y una notable pérdida del pelaje.





**Figura 18.** Sobrevida de los ratones a lo largo de la infección experimental con el aislado TEVA1. Las líneas representan el curso promedio de la supervivencia a lo largo de la infección experimental, cada punto corresponde a la media aritmética de las réplicas utilizadas y las barras representan su error estándar asociado.

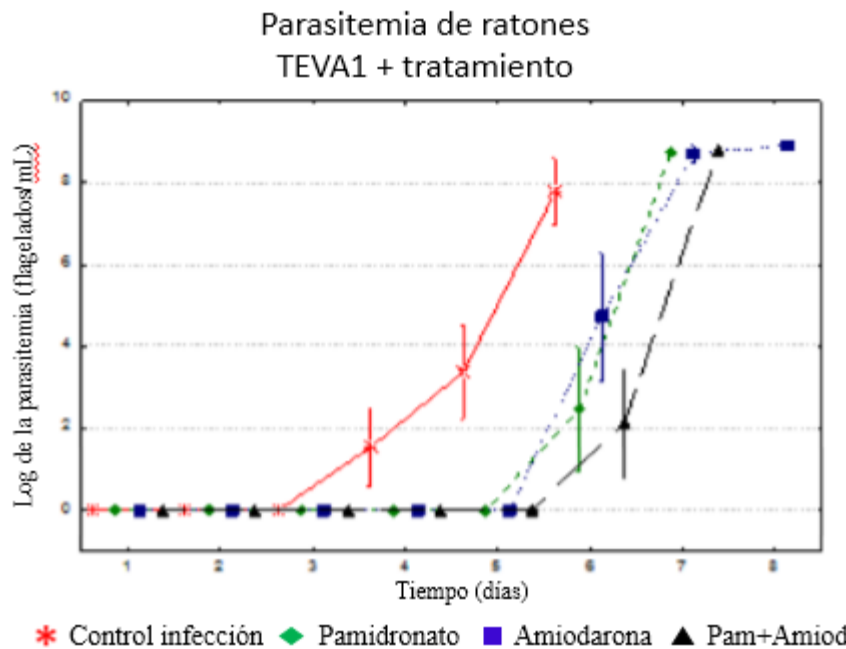
La figura 18 muestra la supervivencia de los grupos experimentales infectados con el aislado TEVA1. Los ratones pertenecientes al control infección murieron a los 7 días mientras que los ratones tratados con pamidronato y con la combinación pamidronato + amiodarona murieron a los 8 días. Por su parte, los ratones que recibieron el tratamiento con amiodarona murieron en el día 9.



**Figura 19.** Sobrevida de los ratones a lo largo de la infección experimental con el aislado FRIO. Las líneas representan el curso promedio de la sobrevivida a lo largo de la infección experimental, cada punto corresponde a la media aritmética de las réplicas utilizadas y las barras representan su error estándar asociado

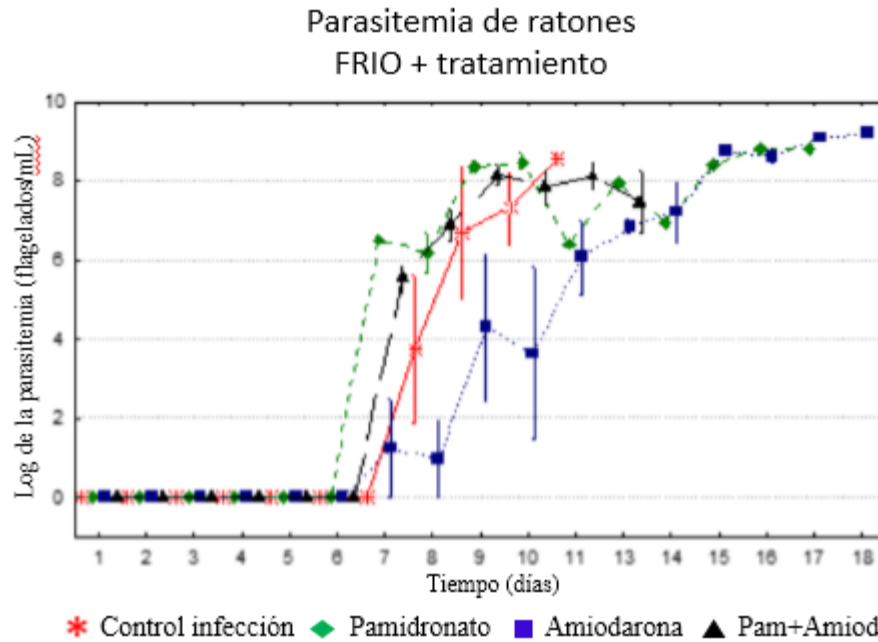
En la figura 19, que corresponde a la sobrevivida de los ratones infectados con el aislado FRIO, se aprecia que todos los ratones pertenecientes al grupo control infección, murieron al día 12, los ratones del grupo tratado con pamidronato + amiodarona murieron en el día 14, los pertenecientes al grupo pamidronato murieron en el día 17 y por último los ratones del grupo tratado con amiodarona murieron en el día 19 de la infección experimental.

Se hizo seguimiento del desarrollo de la infección a través de la parasitemia, que es un parámetro íntimamente asociado con el progreso de la enfermedad en el hospedador y es una estimación de la cantidad de parásitos presentes por ml de sangre del animal infectado.



**Figura 20.** Variación de la parasitemia en los ratones a lo largo de la infección experimental con el aislado TEVA1. Las líneas representan el curso promedio diario de la parasitemia a lo largo de la infección experimental, el eje “y” muestra el logaritmo de los valores de parasitemia obtenidos. Cada punto corresponde a la media aritmética de las réplicas utilizadas y las barras representan su error estándar asociado.

La figura 20 muestra que para el aislado TEVA1, en 3 días se observaron los primeros parásitos en sangre periférica. Este aislado tiene un comportamiento de infección aguda, en la cual se alcanzan, en un periodo de tiempo corto, parasitemias muy altas. En los grupos experimentales con los tratamientos se observa que se prolongó el tiempo de aparición de las parasitemias más altas, con respecto al grupo control sin tratamiento. Sin embargo, luego de alcanzados estos niveles de parásitos en sangre, todos los animales mueren.



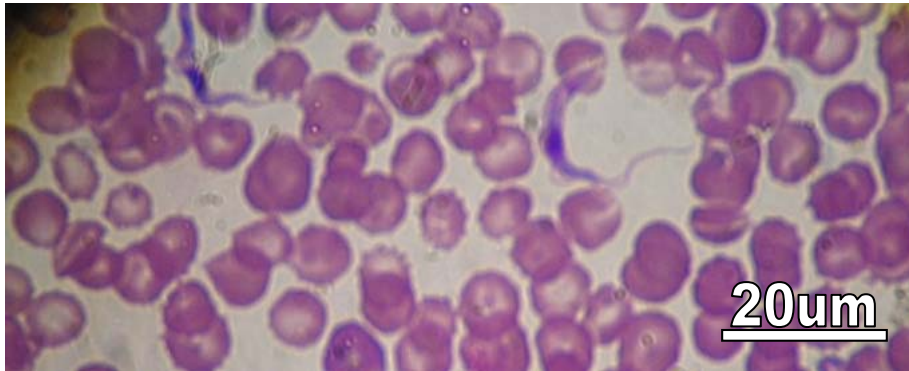
**Figura 21.** Variación de la parasitemia en los ratones a lo largo de la infección experimental con el aislado FRIO. Las líneas representan el curso promedio diario de la parasitemia a lo largo de la infección experimental, el eje “y” muestra el logaritmo de los valores de parasitemia obtenidos. Cada punto corresponde a la media aritmética de las réplicas utilizadas y las barras representan su error estándar asociado.

En contraste a lo anterior, el aislado FRIO desarrolla una infección del tipo crónica. Los primeros parásitos visibles en sangre se observaron el día 7 post-infección. . Todos los grupos experimentales mostraron fluctuaciones u ondas de parasitemia que son típicas de una infección crónica. Estas fluctuaciones son más acentuadas en los grupos con tratamientos con respecto al grupo control infectado sin tratamiento.

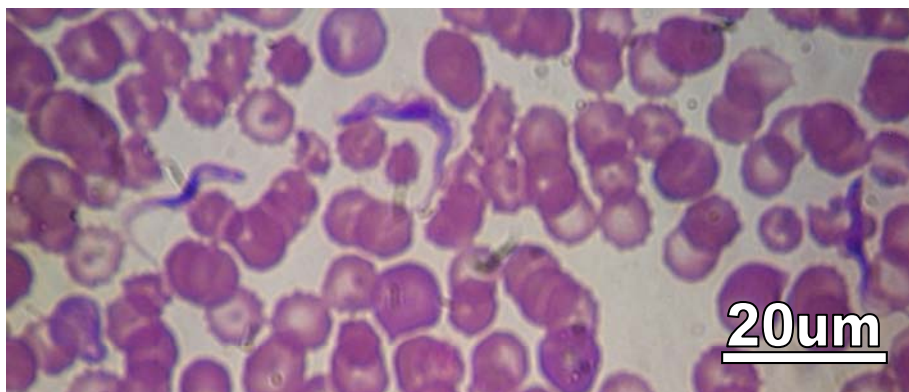
#### **5.4 Morfometría a frotis sanguíneos.**

Partiendo de extendidos de sangre coloreados utilizando el protocolo GIEMSA, se obtuvieron los resultados del análisis morfométrico de *T. evansi* durante la infección experimental en murinos con los aislados FRIO y TEVA1. Estos extendidos de sangre se llevaron a cabo a diferentes puntos de parasitemia, en el caso de la infección con el aislado FRIO se tomaron a los 9, 11, 15 y 17 días, mientras que en el caso de la infección con TEVA1 se tomaron a 5 y 7 días.

En las figuras 22 y 23 pueden apreciarse las fotos de los extendidos sanguíneos del día 7 post-infección para el aislado TEVA1 y del día 16 post- infección para el aislado El FRIO. En ellas se distingue la membrana ondulante, el flagelo, el núcleo en el centro del parásito y hacia el extremo posterior, el quinetooplasto.



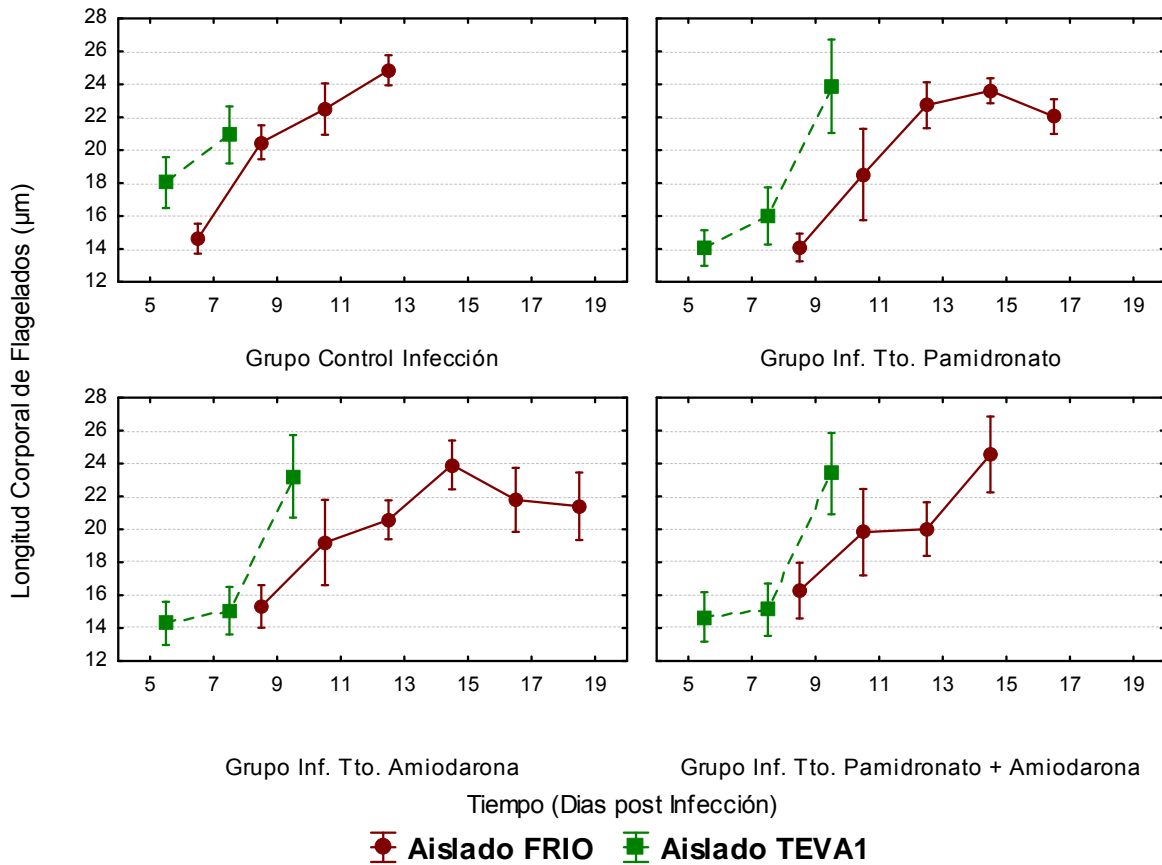
**Figura 22.** Fotos de extendidos tomados durante la infección experimental con el aislado TEVA1 que muestra cuatro tripomastigotes en sangre donde se observa la membrana ondulante, el flagelo, el cinetoplasto y el núcleo.



**Figura 23.** Fotos de extendidos tomados durante la infección experimental con el aislado FRIO, que muestra cinco tripomastigotes en sangre en los que puede observarse la membrana ondulante, el flagelo, el cinetoplasto y el núcleo.

Estas imágenes de extendidos de los parásitos a lo largo de la infección experimental, permiten hacer medidas y cuantificar posibles cambios entre los tripomastigotes de ambos aislados de *T. evansi* durante las infecciones experimentales con los aislados TEVA1 y FRIO, al aplicar los tratamientos con drogas. Para ello se tomaron medidas de la longitud corporal (LC) y el ancho corporal (A) de los tripomastigotes. Los resultados se presentan a continuación

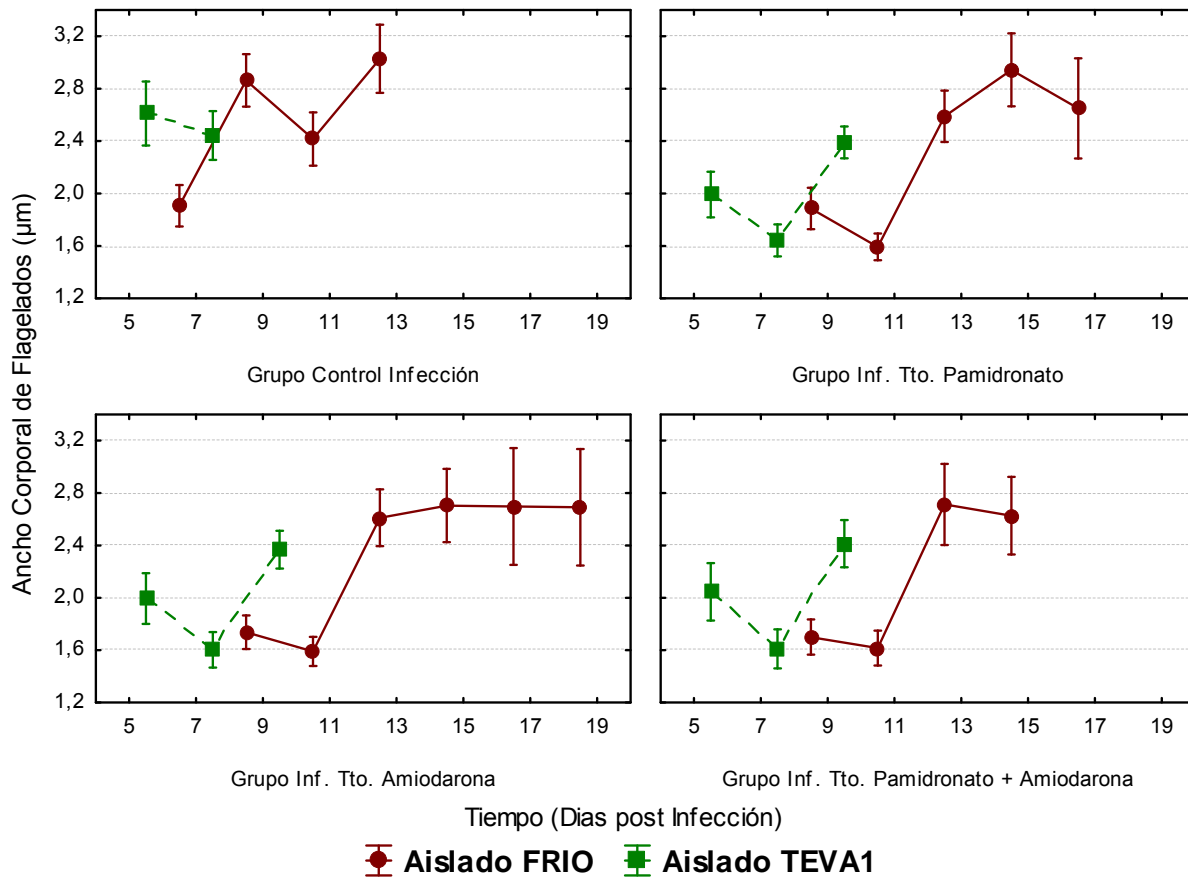
### 5.4.1 Longitud Corporal (LC)



**Figura 24.** Cambios en la longitud corporal de los aislados TEVA1 y FRIO de *T. evansi* a lo largo de una infección experimental durante el tratamiento con pamidronato, amiodarona y la combinación de ambos.

La figura 24 muestra como la variable “longitud corporal” es afectada durante los tratamientos con pamidronato, amiodarona y la combinación de ambas drogas, para ambos aislados. Los resultados muestran que los tripomastigotes aumentan su longitud bajo los efectos de los tres tratamientos empleados.

### 5.4.2 Distancia de Ancho Corporal (A)



**Figura 25.** Cambios en el ancho corporal de los aislados TEVA1 y FRIO de *T. evansi* lo largo de una infección experimental durante el tratamiento con pamidronato, amiodarona y la combinación de ambos.

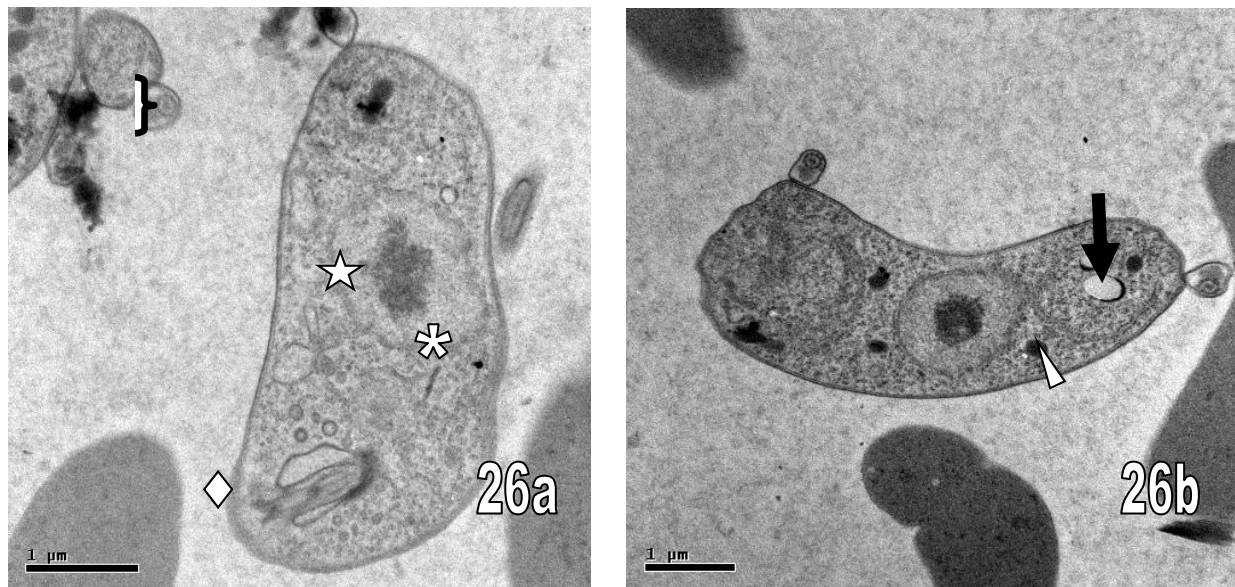
Podemos observar en la figura 25 un aumento en el ancho de los tripomastigotes a lo largo de la infección experimental con los tres tratamientos, sin embargo, en una primera etapa, entre los días 5 y 7 para TEVA1 y los días 9 y 11 para FRIO, hay una disminución de esta variable (reducción) que posteriormente se transforma en un ensanchamiento hasta llegar a un nivel superior al inicial.

### 5.5 Ultraestructura de *T. evansi* a lo largo del tratamiento *in vivo* con pamidronato y amiodarona

A continuación, se describen las variaciones ultraestructurales de los parásitos durante la infección experimental en ratones con los dos aislados de *T. evansi* a lo largo de un tratamiento con

pamidronato. Para el aislado FRIO se tomó una muestra a los 7 días post-infección (punto medio de parasitemia) y 14 días post-infección (punto alto de parasitemia) mientras que para el aislado TEVA1 se tomó sólo un punto a los 7 días que representó una alta parasitemia.

### 5.5.1 Ultra estructura de parásitos que no recibieron tratamiento

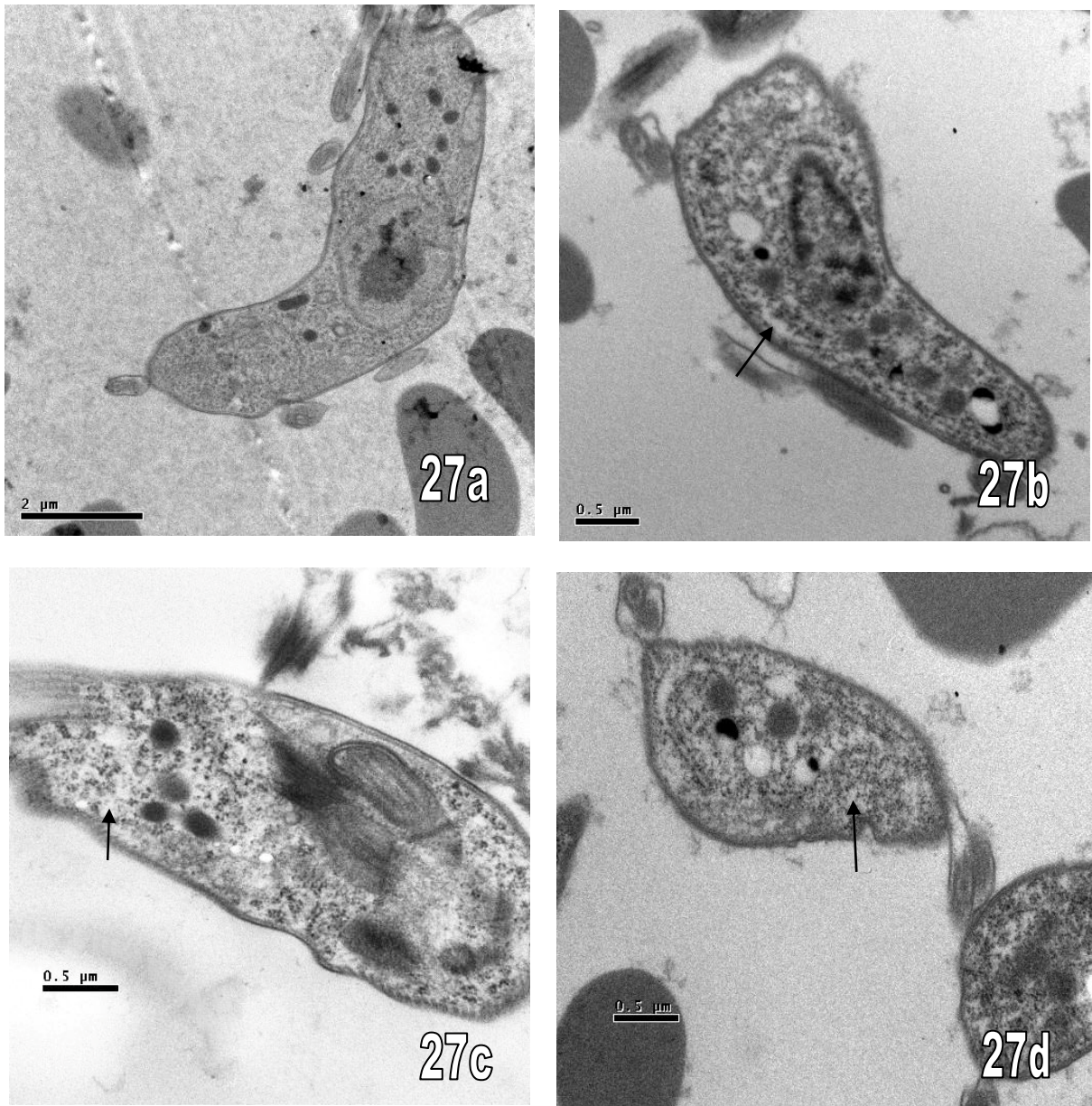


**Figura 26.** Ultraestructura de parásitos de los aislados TEVA1 (26a) y FRIO (26b) tomados de animales experimentales que no recibieron tratamiento alguno a una parasitemia de  $1 \times 10^7$ . Núcleo (estrella), nucleolo (asterisco), glicosoma (triángulo), red de microtúbulos subpeliculares (rombo), un acidocalcisoma (flecha) y sistema flagelar (corchete)

En el caso de el grupo control sin tratamientos, es notable la integridad citoplasmática del parásito, pueden apreciarse estructuras como el núcleo, nucleolo, glicosoma, red de microtúbulos subpeliculares, un acidocalcisoma y flagelos con la tradicional estructura 9x2.



### 5.5.2 Ultra estructura del aislado TEVA1 + Pamidronato (día 7)

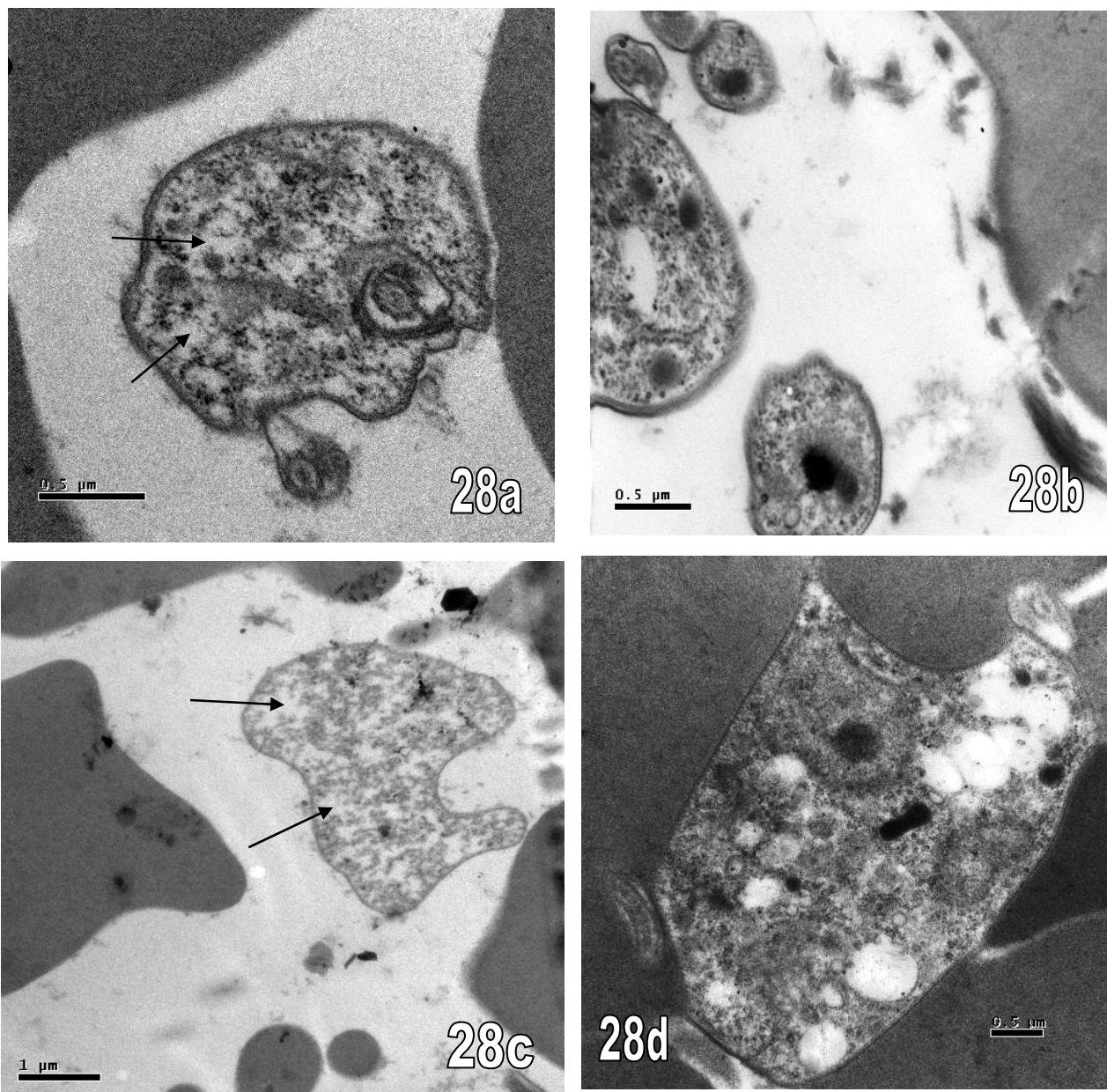


**Figura 27.** Ultraestructura de parásitos del aislado TEVA1 tomados de animales experimentales a los 7 días post-infección durante un tratamiento con pamidronato.

Durante el día 7 del tratamiento con pamidronato para el aislado TEVA1 (punto final de alta parasitemia), puede apreciarse como algunos parásitos como el 27b, 27c y el 27d evidencian zonas de extracción citoplasmática (flechas) que son producto de un daño conducente a la muerte celular, sin embargo en parásitos como el 27a no es apreciable este estado de deterioro. Es

importante resaltar que son igualmente distinguibles las estructuras organelares descritas para el grupo control.

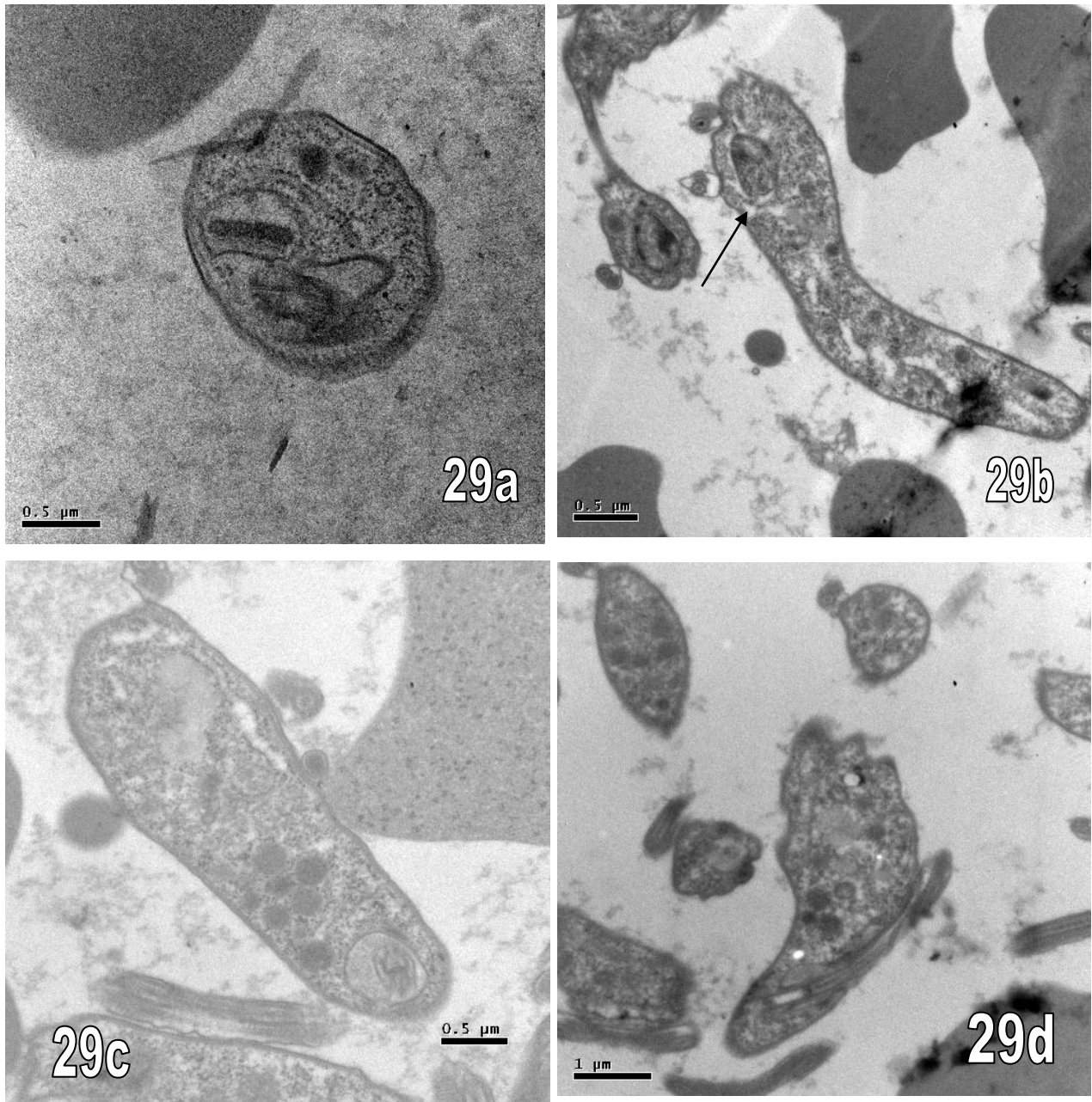
### 5.5.3 Ultra estructura del aislado FRIO + Pamidronato (día 7)



**Figura 28.** Ultraestructura de parásitos del aislado FRIO tomados de animales experimentales a los 7 días post-infección durante un tratamiento con pamidronato.

En la figura 28 que corresponde al tratamiento con pamidronato para el aislado FRIO durante el día 7, puede apreciarse como hay una gran cantidad de zonas con extracción citoplasmática y en casos como la 28c y la 28a hay pérdida de la integridad nuclear.

#### 5.5.4 Ultra estructura del aislado FRIO + Pamidronato (día 16)



**Figura 29.** Ultraestructura de parásitos del aislado FRIO tomados de animales experimentales a los 16 días post-infección durante un tratamiento con pamidronato.

La figura 29 muestra imágenes de parásitos correspondientes al tratamiento con pamidronato para el aislado FRIO durante el día 16. Nuevamente son distinguibles las estructuras comunes de tripanosomatideos como flagelo, núcleo, nucléolo, glicosomas, saco flagelar, entre otras. La figura 29b muestra algunas regiones de extracción citoplasmática, mientras que las figuras 29a, 29c y 29d muestran parásitos sin alteraciones evidentes a nivel subcelular.

## 6. DISCUSIÓN

*Trypanosoma evansi*, es un parásito que ha sido objeto de estudio desde hace varias décadas por ser el agente causal de la tripanosomosis equina, enfermedad con alta prevalencia, particularmente sobre los llanos venezolanos y que ha tenido en el tiempo un impacto negativo importante sobre la ganadería bovina extensiva y algunas otras actividades de producción primaria. (Forlano y col., 2011). Estudios como los de Hoare, 1972 y Quiroz, 2005 han demostrado que este parásito tiene una gran versatilidad para adaptarse a condiciones que le son adversas y además, se han descrito diferentes “razas”, aislados o sinonimias geográficas que tienen características de virulencia y dinámica poblacional marcadamente divergentes, a pesar de pertenecer a una misma especie (Perrone 2003 y Tejero y col. 2008). Esta diferencia de comportamientos ha traído como consecuencia que algunos de los mencionados aislados, cuyo modelo infeccioso se desarrolla con relativa rapidez en roedores, sean utilizados preferencialmente sobre otros cuya dinámica poblacional se ajusta más a un modelo de valores de parasitemia bajos y fluctuantes en el tiempo. De allí que aislados de *Trypanosoma evansi* como el llamado TEVA1, hayan sido utilizados en numerosas publicaciones inherentes a este parásito (Finol, 2001, Tejero. 2008, Mendoza 2008, Andrade 2011, y otros), por constituirse como un modelo “conveniente” de infección cuya duración es de alrededor de 7 días, no obstante, otros aislados como FRIO, Mantecal y TeGub-323, siguen dinámicas poblacionales que, entre otras cosas, pueden prologar la infección hasta 25 días en modelos murinos (Perrone 2003). Mostramos a continuación los resultados de infecciones experimentales y cultivos *in vitro* empleando pamidronato y amiodarona sobre los aislados TEVA1 y FRIO de *Trypanosoma evansi* cuyos comportamientos son diferentes, representando así la mencionada heterogeneidad.

### 6.1 Establecimiento de cultivos *in vitro*

En el presente trabajo de investigación, hemos hecho un esfuerzo por establecer un medio de cultivo que viabilice el crecimiento *in vitro* de *T. evansi*. Para éste propósito, fueron ensayados 13 diferentes medios de cultivo combinando distintos suplementos (Tablas 4, 5 y 6) y partiendo de intentos previos reportados por Baltz y col. 1985, Zwegarth y Kaminsky 1992, Duszenko 2006 que logra definir un medio de cultivo para *T. brucei* y Sanabria 2011 quien reprodujo el medio de

Duszenko (2006) utilizando suero fetal equino en lugar de suero fetal bovino para cultivar *T. evansi* de manera exitosa con una duración de 96 horas.

Autores como Michels (1988), Urbina (1994) y Tielens y Van Hellemond (1998), han estudiado en detalle el metabolismo de tripanosomatideos africanos como *Trypanosoma brucei* y a partir de estos trabajos se han propuesto medios de cultivo que cumplen con las exigencias metabólicas de estos parásitos. Si bien *T. evansi* es un tripanosomatideo de éste grupo de parásitos, el hecho de que no sea capaz de crecer en cultivos axénicos durante largos períodos de tiempo sugiere que existen factores de crecimiento que deben estar disponibles en el medio de cultivo y que estarían relacionados estrechamente con la biología del parásito.

Duran y col, en 2010 califican a los cultivos de tripanosomatideos *in vitro* como modelos experimentales que han permitido avanzar con mayor rapidez en la caracterización y descripción morfológica y química de parásitos. *T. evansi* tiene ciertas características químicas y metabólicas poco estudiadas hasta ahora, y ésta, entre otras razones, derivan en que no se haya establecido aún un medio de cultivo que permita su mantenimiento *in vitro*, a diferencia de otros tripanosomatideos tales como *Leishmania sp.* y *Trypanosoma cruzi*. Ante esta realidad, la investigación con *T. evansi* de los últimos años se ha desarrollado en modelos *in vivo* en los cuales hay múltiples factores que afectan y condicionan la interacción de la droga con el parásito tales como metabolitos secundarios de la degradación de la droga, tiempos de vida media, entre otros, lo cual dificulta el estudio del mecanismo de acción de la droga directamente sobre el parásito.

En el presente trabajo utilizamos medios de cultivo suplementados con suero fetal bovino o con suero fetal equino, dado que el suero fetal bovino ha sido tradicionalmente utilizado para cultivos de *T. brucei* mientras que el suero fetal equino pertenece a los principales hospedadores naturales de *T. evansi* en Venezuela. Adicionalmente, estos medios se probaron en presencia y en ausencia de células alimentadoras “VERO” ya que Zweggart y Rottcher en 1986 sugieren que estas células tipo fibroblasto pueden liberar factores de crecimiento al medio que favorecen el desarrollo del parásito, además de asemejar al medio natural donde se desarrollaría el parásito en condiciones naturales

El primero de los medios de cultivo empleados (que funcionó como medio “control”) fue Buffer Fosfato Salino Glucosado (PBSG), en presencia y en ausencia de células VERO. Se colocaron en el cultivo los aislados de *T. evansi* extraídos en fase de crecimiento exponencial lo cual según Saldaña y col. 2006 es lo más adecuado para la evolución del cultivo, y a una concentración de  $1 \times 10^4$  parásitos/mL. Como se muestra en la tabla 4 los parásitos sobrevivieron hasta las 24 horas. Este resultado se debe a que en el PBSG los parásitos sólo cuentan con glucosa como fuente de energía y no hay nutrientes capaces de satisfacer las necesidades metabólicas del parásito, lo cual lógicamente impide que se lleven a cabo procesos vitales como la división celular.

Ante esta realidad, es evidente que deben incluirse en el medio de cultivo algunos otros elementos que no solo mantengan a la población parasitaria sino que también le permitan replicarse, para ello fue utilizado un medio DMEM como el descrito inicialmente en el protocolo de Baltz en 1985. Luego de 24 horas de cultivo no se observó ningún parásito vivo (Tabla 5), sin embargo, cuando este medio fue suplementado con piruvato sódico, hipoxantina y L-Glutamina, el aislado TEVA1 se mantuvo en el cultivo durante 72 horas, este resultado sugiere que estos componentes son esenciales para el desarrollo de las poblaciones de parásitos. Tielens en 1998 postula que en el metabolismo energético de la forma sanguínea de *T. brucei* (antecesor de *T. evansi*) tiene como uno de los productos finales de su metabolismo, al piruvato, que a su vez es capaz de alimentar el ciclo de Krebs en la mitocondria. Al haber un exceso de piruvato en el medio, puede estarse estimulando la producción de ATP vía ciclo de Krebs lo cual permite a los parásitos mantenerse por mayor tiempo en el medio de cultivo. La L-glutamina actúa como precursor del glutamato que, según Tielens (1998) es uno de los grandes aminoácidos que actúa como sustrato del  $\alpha$ -cetoglutarato quien a su vez se degrada a succinato como parte del ciclo de Krebs.

Por último fue utilizada la combinación de los medios comerciales Leibowitz + RPMI siguiendo lo descrito por Zweggart y Rottcher en 1986, bajo estas condiciones se logró mantener a los parásitos vivos y en crecimiento durante tiempos variantes según los suplementos (Tabla 6). Los medios de cultivo suplementados con suero fetal equino mostraron ser más favorables para el crecimiento y mantenimiento de los cultivos debido a que proviene del hospedador natural del parásito, sin embargo, en contraste con cultivos de *T. brucei*, los aislados de *T. evansi* estudiados,

requirieron un ajuste de la concentración de suero equino hasta un 5 % cuando el cultivo se llevó a cabo en presencia de células VERO.

Una vez que fueron evaluados los distintos medios de cultivo, seleccionamos el que evidenció mejores resultados. El medio RPMI suplementado con suero fetal equino, células vero y glicerol permitió que la población parasitaria se mantuviera hasta 120 horas para ambos aislados, tiempo en el cuál es posible evaluar el efecto de pamidronato, amiodarona y la combinación de ambas drogas, sobre diferentes poblaciones de *T. evansi*. El medio de cultivo seleccionado, posee a diferencia de los otros 12 medios probados, (1) Suero fetal equino, (2) células VERO y (3) glicerol. Presuntamente estas tres variables pudiesen estar involucradas en el mejor rendimiento de este medio sobre los demás. El suero fetal equino, como fue mencionado anteriormente, es suero del principal hospedador de *T. evansi* en Venezuela. Tomando en cuenta que estos aislados son venezolanos, este factor puede ser muy relevante. Las células VERO, pueden propiciar un microambiente más similar al sanguíneo, mediante la liberación de factores de crecimiento siguiendo la teoría de Zweggartt y Rottcher en 1986; y por último el glicerol es uno de los productos finales de la degradación de carbohidratos en el glicosoma y por ello, su acumulación en el medio externo pudiese estar estimulando la salida de glicerol-3-fosfato al citoplasma (en lugar de su transformación en glicerol), para ser utilizado por la glicerol-3-fosfato dehidrogenasa mitocondrial enviando electrones a la cadena transportadora via Ubiquinol citocromo C-reductasa.

## **6.2 Efectos del Pamidronato y la Amiodarona sobre la sobrevida de *T. evansi* in vitro.**

Tomando en cuenta que el medio descrito anteriormente parece resultar más adecuado para el crecimiento de los aislados TEVA1 y FRIO de *T. evansi*, el mismo fue utilizado para establecer los cultivos en donde se probaría el efecto del pamidronato, la amiodarona, y la combinación de ambas drogas, sobre ambos aislados. De acuerdo a Urbina en 1999, en ensayos del efecto del pamidronato sobre *T. cruzi* el IC<sub>50</sub> para esta droga es de 60 uM. Este antecedente es utilizado por Sanabria en 2011 quien sugiere que el IC<sub>50</sub> de la misma droga sobre cultivos de *T. evansi* es de 25 uM; sin embargo este reporte es sólo para el aislado TEVA1. Tomando en cuenta estas dos experiencias previas se decidió evaluar concentraciones crecientes: 5, 10, 20, 30, 50, 100 y 200 uM.



Los resultados para el aislado TEVA1 (figura 6) muestran que el pamidronato a baja concentración (5 y 20  $\mu\text{M}$ ) no evidencia ningún efecto parasitostático ni parasiticida en el cultivo, mientras que a 50  $\mu\text{M}$  y a 100  $\mu\text{M}$  se alcanza la inhibición de 40% de crecimiento de la población. Es importante resaltar que cuando se empleó la concentración de 200  $\mu\text{M}$  se observó una inhibición de la viabilidad de las células VERO en el cultivo.

El efecto del pamidronato sobre el aislado FRIO, aun cuando muestra en la figura 7 la inhibición del crecimiento con un efecto dosis-dependiente, no logra impedir la aparición de ondas parasitarias u oscilaciones durante el crecimiento del cultivo. Una posible explicación para este comportamiento es que el pamidronato puede estar actuando sobre poblaciones de tripomastigotes que tengan mayor sensibilidad a la misma, mientras otra población minoritaria está comenzando a multiplicarse, convirtiéndose en la población de recambio para la próxima onda parasitaria.

Se ha descrito que la acción tripanocida del pamidronato ocurre a través de los pirofosfatos orgánicos. Algunos como P2 O74 y PPI y otros de cadenas cortas, tri y tetra polifosfatos son los que tienen mayor energía (10-15 veces más energía que el ATP) de los compuestos fosfatos en tripanosomatídeos como *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. mexicana* y algunos parásitos apicomplexa como *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium falciparum* (Rodríguez-Poveda, 2012). En los tripanosomatídeos, el PPI se distribuye en toda la célula, sin embargo se concentra en los organelos especializados conocidos como ácidocalcisomas, que son vacuolas ácidas con grandes cantidades de  $\text{Ca}^{++}$ . La presencia de enzimas PPI de *T. cruzi* como la proton-translocación pirofosfatasa en ácidocalcisomas y la piruvato fosfato diquinasa en glicosomas confirma que PPI cumple un importante rol en la supervivencia del parásito, y la inhibición de éstas por bisfosfonatos afecta la proliferación de los parásitos. No obstante, muy altas concentraciones de esta droga son requeridas para ejercer este efecto tripanocida, concentraciones que en nuestro medio de cultivo no pueden ser utilizadas por la susceptibilidad de las células VERO y que en ensayos *in vivo* pueden ser causantes, entre otras cosas, de severo daño renal en el hospedador (Andrade 2011)

Partiendo de la curva dosis-respuesta para el pamidronato con ambos aislados que puede apreciarse en la figura 8, fue calculado el  $\text{IC}_{50}$  que es la concentración a la cual se alcanza un 50% de

inhibición de la población parasitaria en los cultivos de estos dos aislados con comportamiento parasitológico diferente. Sanabria en 2011, sugiere que el  $IC_{50}$  para el pamidronato sobre el aislado TEVA1 de *T. evansi* es de 25  $\mu$ M, sin embargo, en nuestros resultados el  $IC_{50}$  del pamidronato sobre TEVA1 es de 180  $\mu$ M. Claramente existe una gran diferencia en la concentración de droga necesaria para inhibir el crecimiento del 50% de la población; esto podría deberse a las diferencias en el estado metabólico de los parásitos cuando se cultivan en un medio axénico y cuando se cultivan en un medio con células alimentadoras. Como se mostró en las tablas 4, 5 y 6, los cultivos fueron más prolongados en presencia de células VERO, mostrando mayor motilidad de los parásitos. Esto podría sugerir que los parásitos cultivados en un medio axénico, como lo reportado por Sanabria, 2011, son más susceptibles a la acción de drogas, y por ello se requirió una menor concentración de droga para inhibir el crecimiento de la población. Es importante hacer énfasis en que para el aislado TEVA1, con la concentración de 100  $\mu$ M, aún no se alcanza un 50% de inhibición de la población parasitaria, lo cual implica que para tener una estimación fidedigna del  $IC_{50}$ , es necesario utilizar concentraciones más altas, sin embargo, fue mencionado anteriormente que concentraciones mayores de pamidronato hacen inviables a las células VERO en el medio de cultivo. Este resultado sugiere que nuestro medio de cultivo no nos permite utilizar una concentración de pamidronato tal que se alcance un 50% de inhibición.

Por otro lado, nuestros resultados muestran valores diferentes del  $IC_{50}$  para los dos aislados de *T. evansi*, siendo consistentemente menor para el aislado FRIO. Este resultado pareciera indicar que a pesar de pertenecer a la misma especie, los aislados TEVA1 y FRIO tienen sensibilidades divergentes ante las drogas probadas en este estudio. Esto pudiera tener relación con la heterogeneidad genética y bioquímica descrita entre aislados de *T. evansi* Perrone (2003) y Gonzalez (2010). Por otro lado, ha sido descrito ampliamente la resistencia de estos parásitos a los tratamientos quimioterapéuticos más utilizados, como lo son la quinapiramina, isometamidio, entre otros; esta resistencia adquirida por presión del uso continuo e inadecuado, puede generar estas diferencias en el comportamiento de los diferentes aislados.

Con respecto a la amiodarona, podemos apreciar en la figura 9 un resultado similar, en el cuál para el aislado TEVA1 las concentraciones bajas de 2 y 5  $\mu$ M no evidencian un efecto diferente al grupo control, mientras que concentraciones de 7.5 y 10  $\mu$ M sí parecen ejercer un

efecto de disminución de la población de tripomastigotes en cultivo. De igual manera, posiblemente por las mismas razones anteriormente expuestas, los resultados de amiodarona sobre el aislado FRIO son de heterogeneidad marcada (figura 10), sin embargo desde las 96 horas puede apreciarse que 7.5 y 10 uM parecen ser las concentraciones más efectivas en cuanto a la reducción de la población parasitaria.

Los esteroides son estructuras esenciales en las membranas plasmáticas, regulando su permeabilidad y fluidez y modulando la actividad de unión a la membrana y de los canales iónicos. Además, los esteroides sirven como moléculas bioactivas, las cuales pueden actuar en concentraciones nanomolares como reguladores del ciclo celular y el desarrollo. Siendo los esteroides moléculas tan importantes para estos organismos, cualquier desestabilización en su biosíntesis y en su concentración en las membranas produciría efectos negativos sobre la proliferación de la población parasitaria. Extrapolando esta aseveración a lo observado en nuestros resultados, si bien ninguna de las dos drogas produjo una inhibición completa sobre la población de tripanosomas, de alguna manera se redujo su tasa de multiplicación *in vitro*.

Ante esto, la inhibición observada en los cultivos, la cual pareciera del tipo parasitostática, particularmente en los tratamientos con amiodarona podría deberse en parte a la desestabilización de la homeóstasis mitocondrial del  $\text{Ca}^{+2}$  y a la alcalinización de los acidocalsisomas, como ha sido reportado para *T. cruzi* y *Leishmania* (Benaïm y col 2006, Serrano-Martin y col. 2009b), lo cual la hace una droga muy potente contra estos tripanosomatídeos. Es probable que estos cambios en la concentración del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular no sea suficiente para afectar la viabilidad de *T. evansi in vitro*. Cohen y col 1990, por ejemplo reportan que la anfotericina B eleva la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular en promastigotes de *Leishmania braziliensis*; sin embargo demostraron que la muerte del parásito producida por este fármaco era independiente del incremento de los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. De hecho, el efecto parasitocida se potenciaba en ausencia de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular.

A partir de la figura 11, fue calculado el  $\text{IC}_{50}$  de la amiodarona, los resultados muestran que sobre el aislado TEVA1 es de 11.546 uM sobre el aislado FRIO de 7.629 uM. Se observa nuevamente que el aislado FRIO es más susceptible que el aislado TEVA1 a este tratamiento, debido a que requiere una concentración menor para su inhibición. Sin embargo, más interesante aún es que la

cantidad de amiodarona necesaria para inhibir el 50% de la población parasitaria en el cultivo, es más de 15 veces menor que la concentración de pamidronato necesaria para la misma inhibición. Teniendo en cuenta esto, sumado a que los resultados en términos de disminución de la población parasitaria fueron muy similares para los dos tratamientos, podemos decir que luego de los experimentos *in vitro* la amiodarona se muestra más eficiente que el pamidronato.

Por último, la evaluación de la interacción entre ambas drogas, cuando el tratamiento se aplicó combinado, se llevó a cabo mediante la construcción de un isoblograma. Los primeros isobogramas fueron publicados por Fraser a finales del siglo XIX y presentaban una interacción de tipo antagónico para el efecto letal de las combinaciones entre atropina y fisostigmina (Fraser, 1870; 1872). Desde entonces existen numerosos reportes que utilizan los isobogramas como método de análisis de combinaciones de diversos fármacos (Ossipov y col., 1990; Lee y Yaksh, 1995; Puig y col., 1996; Cheng y col., 2000; Montes y col., 2000; Poveda y cols, 2003). En el campo de la parasitología, Urbina (1993) utilizó isobogramas para demostrar el efecto sinérgico de meviolin con ketaconazol y con terbinafina sobre *Trypanosoma cruzi*.

Según Berembaum (1989) cuando la combinación de dos fármacos es más efectiva de lo que se espera se requieren menos cantidades de ambos para producir el mismo efecto, entonces se define un isoblograma cóncavo que sugiere sinergia entre ambas drogas ( $FIC < 1$ ). Por otra parte, cuando los agentes en combinación son menos efectivos que lo esperado sus concentraciones deberían ser incrementadas con el fin de obtener el mismo efecto, siendo entonces antagónicas ( $FIC > 1$ ), la ecuación en este caso describe un isobolo convexo. Por último, cuando los agentes no interaccionan (interacción cero) los puntos que representan las dosis isoeffectivas de la combinación están situados sobre el isobolo formando una línea recta ( $FIC = 1$ ).

Nuestros resultados muestran como las concentraciones empleadas para tratar a los parásitos *in vitro* con la combinación de pamidronato y amiodarona se mantienen dentro de la línea recta que describen los  $IC_{50}$  calculados para ambas (figura 14). De modo que no existe ningún tipo de interacción entre ellas con un  $FIC = 1$ .

### **6.3 Efectos del pamidronato y la amiodarona sobre la infección producida por *T. evansi* en ratones.**

Los ensayos *in vitro* son una manera expedita y relativamente sencilla de evaluar la efectividad de drogas sobre algunos parásitos como los tripanosomatideos, no obstante, no podemos olvidar que el fármaco y el parásito no son los únicos elementos de una infección en condiciones naturales. El metabolismo del hospedador juega un papel determinante en la farmacocinética de una droga, incluso el procesamiento metabólico de esa droga puede resultar en metabolitos que no necesariamente tienen el mismo efecto de la droga en el cultivo, por lo tanto existen múltiples maneras en las cuales puede verse afectada la interacción fármaco-parásito con el estudio en el hospedador vertebrado.

Para evaluar el efecto de un fármaco, la primera condición que debe monitorearse es la del hospedador y su respuesta al tratamiento. Se han descrito efectos secundarios de la amiodarona por su acumulación en el hígado su administración en humanos debe ser acompañada de un monitoreo de la función hepática, aun así, no hay registro de que esto implique incidencias significativas en la variable peso corporal. Sin embargo, Andrade (2011) describe la forma en que el pamidronato afecta los riñones de ratones, siendo esta alteración causa de una disminución de peso en ese modelo experimental.

#### *6.3.1 Desarrollo de la parasitemia y sobrevida de los animales*

En los estudios de comportamiento parasitológico de hemoparásitos como *Trypanosoma evansi*, la forma más directa de evaluar el desarrollo de la enfermedad es la cuantificación de la parasitemia, que no es más que la determinación de la cantidad de parásitos presentes en un ml de sangre. Dado que *T. evansi* se encuentra circulante en sangre, el seguimiento de las parasitemias durante una infección experimental, proporciona información acerca de la capacidad infectiva del parásito así como de su patogenicidad; y además permite evaluar el efecto de tratamientos anti-tripanosoma sobre el crecimiento de la población de parásitos.

De acuerdo a lo que se muestra en las figuras 20 y 21, los aislados TEVA1 y FRIO parecieran seguir dos dinámicas poblacionales diferentes. Al comparar el efecto de los tratamientos, se observó que en todos los casos, prolongaron el tiempo de aparición de las parasitemias máximas con respecto al grupo control infectado; esto se traduce directamente en la prolongación de la vida de los animales, ya que a medida que los parásitos tardan en multiplicarse, los efectos patológicos del parásito sobre el hospedador también tardan en aparecer. A pesar de que la población parasitaria no fue erradicada por ninguno de los tratamientos empleados, este resultado reviste gran importancia en atención a un término muy escuchado en el contexto del trabajo de campo con animales infectados. Ese término es el “equilibrio enzootico”, que implica mantener a los parásitos en un equilibrio dinámico con el hospedador infectado. Dicho equilibrio es posible por la característica de que el sistema inmunológico es capaz de mantener a raya el crecimiento de la población parasitaria, y el hospedador, a pesar de estar infectado, no perece. No obstante cuando el sistema inmunológico se ve influenciado por factores externos como sequía, menor disponibilidad de alimentos o cualquier otra causa de estrés, la población parasitaria incrementa exponencialmente causando la muerte del mamífero. De allí que muchos autores consideran que los tratamientos contra este tipo de enzootias deben estar dirigidos hacia colaborar con el sistema inmune de los animales ejerciendo un efecto parasitostático sobre la población de parásitos y que su erradicación total es una utopía dado que estos parásitos tienen miles de millones de años en el planeta y siempre habrá un recóndito rincón con un animal infectado desempeñando el rol de reservorio natural.

Al comparar los diferentes tratamientos, los resultados indican que en el modelo experimental utilizado, la administración de amiodarona puede mantener los niveles de parasitemia un poco más bajos durante más tiempo respecto al grupo control. Sin embargo, luego de cierto tiempo, se alcanzan parasitemias máximas, tras las cuales los animales sucumben a la infección. Esto se observa en las infecciones con ambos aislados, lo que sugiere que el efecto de la amiodarona sobre el crecimiento de la población de parásitos es independiente del tipo de aislado empleado para la infección.

En el caso de las parasitemias generadas por el aislado FRIO, en la figura 21 se aprecian fluctuaciones o parasitemias ondulatorias, típicas de una infección del tipo crónica. Estas

fluctuaciones pueden ser producto de la heterogeneidad de comportamiento propia de este aislado, sin embargo, las diferencias entre las curvas parecen no ser suficientes como para concluir que el aislado FRIO está haciendo picos de parasitemia. Los picos de parasitemia si se han descrito para el aislado FRIO (y otros aislados como MANTECAL y 323) en infecciones de hospedadores reales de *T. evansi* como caballos, búfalos y vacas y se deben a la capacidad del parásito para responder al ataque del sistema inmune del hospedador, utilizando unas proteínas llamadas VSG (Glicoproteínas variantes de membrana por sus siglas en inglés). Estas proteínas son capaces de modificar su estructura una vez han sido reconocidas por las células del sistema inmune y estas células deben estar constantemente reconociendo nuevas proteínas en la membrana de estos parásitos (Perrone 2006). Esta adaptación propicia que cuando una población de parásitos está siendo lisada, una nueva población aparezca.

Por otro lado, al aplicar un tratamiento combinado de amiodarona con pamidronato, se esperaba potenciar el efecto de ambas drogas sobre la población de parásitos; sin embargo, esto no ocurrió. Por el contrario, los animales con este tratamiento mostraron disminución acentuada de peso y desmejoramiento de la condición física respecto al grupo tratado sólo con amiodarona. Este resultado sugiere que la combinación de ambas drogas podría estar generando metabolitos tóxicos para el animal, aumentando los efectos secundarios; si a esto se le adiciona el efecto patológico de los parásitos, se podría acelerar la degeneración de la condición física de los animales tratados y llevarlos rápidamente a la muerte.

### 6.3.2 *Peso corporal*

Una de las características del desarrollo de la tripanosomosis animal causada por *T. evansi* es el desmejoramiento de la condición física acompañada de la pérdida progresiva de peso; es por ello que se evaluó este parámetro como indicador junto a la parasitemia, del desarrollo de la enfermedad. A fin de descartar el efecto de los tratamientos sobre el peso del hospedador, se llevó a cabo en primer lugar un monitoreo del peso de ratones sanos a los cuales se les administró los mismos tratamientos que se administrarían en las infecciones experimentales.

Los resultados muestran como los ratones sanos tratados con pamidronato experimentan una leve disminución de peso en el tiempo, mientras que los que recibieron amiodarona se mantuvieron estable el peso. Esto, según Andrade 2011 posiblemente es debido a un efecto acumulativo del pamidronato en el riñón del hospedador.

Esto coincide con la disminución de peso experimentada por el grupo infectado y tratado con pamidronato. Por otro lado, los grupos tratados con amiodarona también experimentan disminución de peso pero con retardo en el tiempo y un poco menos marcado. Independientemente del tratamiento, se observó disminución de este parámetro ya que este no sólo depende el efecto de la droga sino principalmente del efecto del parásito, el cual utiliza en gran parte la glucosa presente en la sangre y los ácidos grasos del hospedador mermando así su condición metabólica.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos de la evaluación del efecto de las drogas sobre *T. evansi*, tanto *in vitro* como *in vivo*, el pamidronato y la amiodarona no se apuntan como la mejor elección como tratamiento quimioterapéutico para este parásito en particular, dado que la inhibición del crecimiento de la población de parásitos no es completa.

A diferencia de la inhibición observada en los cultivos de *T. evansi*, la inhibición de la proliferación de los parásitos durante las infecciones experimentales en ratones, no parece ser contundente como para considerar a los tratamientos como efectivos. Siendo *T. evansi* un parásito sanguícola, con estadios presentes casi exclusivamente en torrente sanguíneo, ninguno de los dos tratamientos aplicados vía oral e intraperitoneal tuvo un efecto tripanocida. En el caso de *T. brucei*, se ha descrito que los tripomastigotes sanguíneos no sintetizan esteroides de tipo endógeno sino que todo colesterol que contiene proviene del hospedador (Coppens et.al.1998).

Los tripomastigotes de *T. brucei* podrían utilizar el colesterol del hospedador para cumplir con funciones estructurales de las membranas celulares. Desde el punto de vista energético, esto luce coherente ya que este estadio del parásito habita principalmente en el torrente sanguíneo donde hay gran disponibilidad de colesterol; lo cual podría explicar el comportamiento de las infecciones de los dos aislados de *T. evansi* en ratones, donde el pamidronato y la amiodarona mostraron poco efecto inhibitorio, ya que estas drogas tienen como blanco la ruta biosintética del



parásito, mientras que el parásito está aprovechando los recursos del medio, en este caso de su hospedador. Esto en última instancia sugiere la realización del mismo ensayo pero con algún compuesto dirigido hacia los esteroides exógenos.

#### **6.4 Morfometría a frotis sanguíneos.**

Las fotos obtenidas de los extendidos sanguíneos, nos permitieron realizar medidas para analizar desde el punto de vista morfométrico los cambios que pueden estar ocurriendo en el parásito a lo largo de la infección experimental. En trabajos como el de Sanabria (2011) pudieron distinguirse patrones de cambios en la dimensión relativa de la longitud corporal y distancia de ancho corporal a lo largo del desarrollo de los flagelados de los aislados Mantecal y TEVA1. En nuestro caso, utilizando el aislado FRIO y el aislado TEVA1 obtenemos un resultado similar, observando diferencias para las variables de longitud corporal y ancho corporal durante la infección experimental.

Es importante destacar que, incluso cuando diferencias en la virulencia e infectividad de los aislados fueron encontradas y han sido reportadas anteriormente (Perrone *et al* 2003), dichos aislados mostraron un patrón general similar en cuanto a la forma de cambio tanto para la longitud corporal (LC) como para la distancia del ancho corporal (A). Lo que indica que a pesar de tener comportamientos parasitológicos disímiles el aumento de ambas variables medidas a lo largo de la infección es común para los dos aislados (Grafica 3 y 4), esto ha sido explicado también por Tejero *et al.* 2008 y Roschman-Gonzalez, 2001.

*T. evansi* es, según Gil (1977), un tripanosoma monomórfico que únicamente posee formas delgadas “slender”. Esto es consistente con que su forma de reproducción es la fisión binaria, por cuanto un flagelado debería ser idéntico al otro en una misma población. No obstante, (Hoare, 1956) y (Queiroz y col, 2000) han reportado que las formas rechochas “stumpy” pueden aparecer esporádicamente en infecciones experimentales. A pesar de que estudios como los de Dávila y col (1997) disertan sobre las alteraciones morfométricas en poblaciones de parásitos, y su relación con conductas fisiológicas, patológicas y relaciones forma-función, no es sino Gonzalez (2011) quien

estudia a fondo los cambios morfométricos de *T. evansi* durante el desarrollo de una infección experimental con distintos aislados. De allí que el presente trabajo de investigación busca contribuir con la hipótesis de que hay una variación de la forma de los parásitos a lo largo de la enfermedad, discutiendo cuales pueden ser los factores que la ocasionen.

Efectivamente, nuestros resultados muestran como la longitud corporal tiende a aumentar hacia el final de la infección al igual que el ancho corporal y que este aumento es similar para ambos aislados, salvando por supuesto la diferencia de tiempos ya que las infecciones con el aislado TEVA1 llegan a escasos 9 días mientras que con FRIO se extienden incluso hasta 19 días. Esta similitud en la tendencia puede indicar que este proceso de variación morfométrica no depende del morfotipo empleado, sino de factores fisiológicos del hospedador y de eventos propios de la dinámica poblacional del parásito durante la infección experimental. Es importante resaltar que el efecto de los tratamientos es evidente, ya que a pesar de que la tendencia morfométrica es similar, las dimensiones de los parásitos en el grupo control son, en todos los casos, mayores a las de los grupos tratados.

Los primeros días de infección, se caracterizan por un aumento de longitud y disminución de ancho corporal y este comportamiento es coherente con uno de los postulados de la parasitología clásica según el cual formas más delgadas son más virulentas. En ese sentido, ambos aislados en una instancia temprana de la infección muestran un comportamiento virulento mientras que hacia el final de la infección (día 9 para TEVA1 y días 16, 17, 18 y 19 para FRIO) las poblaciones se caracterizan por ostentar altas cargas parasitarias y una próspera evolución de parásitos más largos y también más anchos. Esto podría traer como consecuencia una rápida disminución de los recursos disponibles para los parásitos, generándose en consecuencia, un proceso de competencia intraespecífica. Este proceso, sumado a los efectos de la respuesta inmune del hospedador, provocaría la degeneración de una sub población de parásitos que no poseen suficientes recursos para suplir sus demandas energéticas en un hábitat con una población muy densa. Esto explicaría que la dimensionalidad morfométrica de la población, comienza a disminuir en el momento de la muerte de los hospedadores.

## **6.5 Ultraestructura de *T. evansi* a lo largo del tratamiento *in vivo* con pamidronato y amiodarona**

Los tripanosomatideos ostentan atributos biológicos únicos que los diferencian de cualquier otro grupo conocido, entre ellos podemos mencionar la compartimentización de la vía glucolítica, mitocondria pre-adaptada a cambios mediambientales bruscos, ADN mitocondrial compactado en una red concatenada de maxicírculos y minicírculos, organización particular del citoesqueleto, barra paraxial en el flagelo y un sistema endocítico perfectamente polarizado (De Souza, 1999).

Como ha sido mencionado, son pocos los estudios enfocados en describir los cambios ultraestructurales que experimentan parásitos como *T. evansi* durante una infección experimental, y como se relacionan estas variaciones submicroscópicas con el comportamiento poblacional, la morbilidad y la supervivencia de los hospedadores. En ese sentido, en el presente trabajo nos aproximamos al estudio dinámico de este parásito que, por definición, experimenta cambios a lo largo de su estadía en el hospedador vertebrado.

Nuestras imágenes son el resultado de infecciones experimentales cuyas muestras fueron tomadas en puntos estratégicos de la infección experimental, asumiendo que los puntos seleccionados cubren las alteraciones que se evidencian en el parásito durante infecciones experimentales. Es importante resaltar que la obtención de las muestras de trypanosomatideos para MET deben provenir de ratones con una parasitemia de  $1 \times 10^4$  como mínimo para asegurar su observación al microscopio.

En primer lugar la figura 26a y 26b muestran la ultraestructura de un parásito del aislado TEVA1 y un parásito del aislado FRIO respectivamente luego de una infección experimental en la cual los ratones no recibieron ningún tipo de tratamiento. Son evidentes en ambas imágenes las estructuras organelares típicas de *T. evansi* ampliamente descritas por S. Son apreciables glicosomas, que según Michels (2001) son organelos en los que se ha compartimentalizado toda la maquinaria enzimática necesaria para la glucólisis, es ampliamente conocido que el metabolismo energético del *T. evansi* es predominantemente fermentativo más que oxidativo tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Hannaert y col. 2003) de allí que el glicosoma se constituya como el organelo energético por excelencia por encima de la mitocondria. Puede apreciarse también el

núcleo, con la cromatina condensada al centro formando la estructura que llamamos nucléolo. Un corset de microtúbulos subpeliculares que dan rigidez estructural al parásito y el flagelo con su estructura de nueve pares de microtúbulos periféricos por un par central.

Dada la agudeza de la infección con el aislado TEVA1, no pasa mucho tiempo desde que se alcanza la parasitemia mínima observable al M.E.T. hasta la muerte del hospedador, de allí que, para este aislado, sólo tengamos un punto de referencia a los 7 días que se corresponden con el final de esta infección experimental durante el tratamiento con pamidronato. En términos cualitativos, la ultraestructura de TEVA1 no cambia de manera importante durante la infección. Se observa un ligero incremento en el área de los tripomastigotes que se debe al crecimiento alométrico positivo que se observa en muchos organismos a lo largo de su ontogenia y que fue evidenciado en el análisis morfométrico previo. También pueden apreciarse la pérdida del contenido citoplasmático que es observado como zonas electrón transparentes dentro del parásito (Roschman-González, 2010) Figuras 27a y 27c.

En el caso del aislado FRIO, nuevamente podemos apreciar diferencias evidentes con respecto a TEVA1, vemos como a los 7 días se evidencia una población, en general, mucho más deteriorada, con mayores áreas de extracción citoplasmática que según (Roschman-González, 2010) pueden estar relacionadas con extracción proteica por cambios en la estructura de las proteínas a medida que avanza la infección. Pérdida de la integridad nuclear, ausencia organelar, condensación de la cromatina, todo esto asociado con procesos de muerte celular (Soeiro et al. 2007; De Souza et al. 2010; Duszenko et al. 2006, entre otros)

En este punto puede apreciarse un efecto claro del tratamiento con pamidronato, sin embargo, al día 16 de la infección experimental se observan nuevamente parásitos en buen estado con las estructuras organelares típicas lo cual es señal de un incremento de la población no afectada por la droga. Este resultado ultraestructural se corresponde con la dinámica observada en los resultados de parasitemia y sobrevivencia en los cuales es evidente que el tratamiento es capaz de neutralizar a una población inicial de parásitos pero que luego es incapaz de mantener este efecto en el tiempo, de modo que al final de la infección ya la población predominante es de parásitos sanos que finalmente acaban con la vida del hospedador.

## 7. CONCLUSIONES

- De los medios de cultivo ensayados experimentalmente, el medio constituido por RPMI, glicerol y células alimentadoras VERO, proporcionó las mejores condiciones de crecimiento y sobrevivencia de aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi* en condiciones *in vitro*.
- El medio estandarizado para el crecimiento *in vitro* de aislados venezolanos de *T. evansi* (RPMI, glicerol y células alimentadoras VERO) constituye un modelo adecuado para la evaluación del efecto de tratamientos quimioterapéuticos con pamidronato y amiodarona.
- Los tratamientos con pamidronato y amiodarona sobre cultivos *in vitro* de *T. evansi* mostraron una dependencia de la dosis aplicada; sin embargo con ninguna de las dos drogas se logra una inhibición completa del crecimiento de la población de parásitos, lo cual sugiere que en este modelo, las drogas tienen un efecto parasitostático.
- La combinación de pamidronato y amiodarona no evidencia una interacción sinérgica que potencie su efecto sobre la viabilidad de los parásitos, se observa un efecto aditivo no mayor al efecto que se obtiene por separado.
- Los tratamientos con pamidronato, amiodarona y la combinación de ambos, fueron capaces de aumentar el tiempo de prepatencia y de prolongar la vida de los animales experimentales, sin embargo no se produjo cura de la enfermedad.
- En infecciones experimentales de ratones con *T. evansi*, los tripomastigotes sanguíneos sufren cambios en su morfología típicamente aguzada, observándose mayor longitud y amplitud del cuerpo del parásito en el tiempo. No obstante, la forma y dimensionalidad de los tripomastigotes sanguíneos expuestos a los tratamientos con pamidronato y amiodarona experimentaron una tendencia de disminución en comparación con el grupo control.
- Los cambios ultraestructurales fueron evidentes para el aislado FRIO durante el tratamiento con pamidronato, sin embargo, a parasitemias altas no se advirtió la presencia de alteraciones subcelulares para ninguno de los aislados venezolanos de *T. evansi* empleados.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Adams, D.C. & Funk, D. 1997. Morphometric inferences on sibling species and sexual dimorphism in *Neoclamisus bebianae* leaf beetles: multivariate applications of the thin-plate spline. *Systematic Biology*, **46**: 108-194.

Andrade, R. 2011. Efecto del pamidronato en ratones infectados experimentalmente por *Trypanosoma evansi*. T.E.G., Departamento de Biología Celular. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

Arbogh, B., Bell, P., Brunk, U., Collins, V. 1976. The osmotic effect of glutaraldehyde during fixation. A transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and cytochemical study. *J. Ultrastr. Res.*, **56**: 339-350.

Arcay, M. y Ojasti, J. 1980. Comportamiento de una cepa de *Trypanosoma venezuelense* (*T. evansi*) aislada de *Hydrochaeris hydrochaeris* (chigüire o capibara) en animales de laboratorio. *Acta Biol. Venez.*, **10**: 391-418.

Arenas, C. 1987. Determinación ultraestructural *in vitro* de azúcares de membrana en algunos miembros de la familia tripanosomatidae, mediante la utilización de lectinas. T.E.G., Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Simón Bolívar.

Arias, J., García, F., Rivera, M. y López, R. 1997. *Trypanosoma evansi* in capybara from Venezuela. *J. Wild. Dis.* **33**: 359-361.

Baltz T., Baltz D., Giroud Ch. y Crockett J. 1985. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *T. Embo. Jour.* **4**: 1273-1277.

Benaim, G., Sanders J., Garcia-Marchan, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J., Leon-Rossel A., Concepcion, J.L., Schijman, A., Levin M., Oldfield, E.

y Urbina, J. 2006. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med. Chem.* **49**: 892-899.

Benítez, M., Pallota, F., Arenas, E., García, J. y Ruiz, A. 1984. Efecto del isometamidium en la infección experimental por *Trypanosoma venezuelense* en ratas y equinos. *Vet. Trop.* **9**: 17 – 28.

Boid, R., El-Amin, E.A., Mahmoud, M.M y Luckins, A.G. 1981. *Trypanosoma evansi* infections and antibodies in goats, sheep and camels in the Sudan. *Trop. Anim. Heal. and Prod.* **13**: 141-146.

Bozzola, J.J. y Russell, L.D. 1992. Electron Microscopy. Specimen staining and contrast methods for transmission electron microscopy. Lones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusetts. pp: 110-133.

Brun, R., Hecker, H. y Lun, Z-H. 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship. *Vet. Parasitol.* **79**: 95-107.

Brusca, R. y Brusca, G. 2003. Invertebrates. Sinauer Associates, Second Edition, Sunderland, Massachusetts. Pp. 978 - 993

Brusca, R. y Brusca, G. 2005. Invertebrados. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid, España. pp. 1005 - 1023

Canelón J.L. y Meléndez R. 2003. Posible origen del *Trypanosoma Evansi* en Venezuela. *Vet. Trop.* **28**:155-167.

Corliss, J. 1994. An interim utilitarian (“user-friendly”) hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta protozool.* **33**: 1-51

Courchesne W. E. 2002. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**:195-199.

Courchesne W. E., Ozturk S. 2003. Amiodarone induces a caffeine inhibited, MID1-dependent rise in free cytoplasmic calcium in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **47**: 223-234.

De Souza, W. 1984. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Inter. Rev. of Cyto.* **86**: 197-283.

Desquesnes, M. 2004. Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America. CIRAD Editorial. France. pp 273 - 278

Docampo R., 2001. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.* **7**: 1157-64.

Duran C., Rodríguez-Bolívar D., Roschman-Gonzalez A., Strauss M. y Tejero F. 2010. Análisis cuantitativo del crecimiento y cambio morfométrico en poblaciones de *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi* mantenidos en cultivos axénicos puros y mixtos. *Biol. Malariol. Salud Amb.* **1**:1-6

Duszenko, M., Figarella, K., Macleod, E., Welburn, S. 2006. Death of a trypanosome: a selfish altruism. *TRENDS Parasitol*, **22**: 536-542.

Finol, H.J., Boada-Sucre, A., Rossi, M. y Tejero, F. 2001. Skeletal muscle ultrastructural pathology in mice infected with *Trypanosoma evansi*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **33**: 65-71.

Forlano M., Meléndez R., y Canelón J. L. 2011. Seropositividad a *Trypanosoma evansi* en caballos criollos infectados naturalmente en tres hatos del estado apure. *T.E.G.* Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Del Zulia



Gardiner C.H., Fayer R. y Dubey J.P. 1988. An atlas of protozoan parasites in animal tissues. U. S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook 651, pp 70-71.

Gibson, W.C., Parr, C.W., Swinglehurst, C.A. y Welch, S.G. 1978. A comparison of the isoenzymes, soluble proteins, polypeptides and free aminoacids from isolates of *Trypanosoma evansi*. *Comp. Biochem. Physiol.* **60B**: 137-142.

Ginsburg, H. y Wolosin, J.M. 1979. Effects of uranyl ions on lipid bilayer membranes. *Chem. Phys. Lipids*, **23**: 125-131.

Girgis-Tanka P. y Dinah M.J. 1974. In vitro uptake of isometamidium in diminazeme by *Trypanosoma brucei*. *Antimicrob. Agent. Chemother.* **6**:372-374.

González, R. y Perrone, T.M. 2003. Purificación de Tripanosomas mediante columnas de DEAE-celulosa. Guía de Laboratorio. Universidad Central de Venezuela

González, R. (2010) Aproximación cuantitativa al análisis de la heterogeneidad de aislados Venezolanos de *Trypanosoma evansi*. *Tesis Doctoral*, Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Hoare, C.A. 1956. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. VIII. Revision of *Trypanosoma evansi*. *J. Parasitol.*, **46**: 130-172.

Hoare, C.A. 1964. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the systematics. *J. Protozool.*, **11**: 200-207.

Hoare, C. A. 1972. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp. 555-592.

Jones, T. y Dávila, A. 2001. *Trypanosoma vivax*- out of Africa. *Trends Parasitol.* **2**:99-101.

Lanham, S. y Goldfrey D. 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other animals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* **28**:521-534.

Leger, M., Tejera, E. 1920. Contribution to the study of *Trypanosoma venezuelense*, Mesnil, 1910. *Bul. Soc. Pathol.* **13**: 576-588.

Losos, G. 1980. Diseases caused by *Trypanosoma evansi*. *Vet. Res. Comm.* **4**: 165-181.

Luckins, A.G. 1998. Epidemiology of surra: Unanswered questions. *J. Protozool. Res.* **8**:106-119.

Luckins, A.G. 1999. Epidemiology of non-tsetse-transmitted tripanosomiasis- *Trypanosoma evansi* in perspective. *Newsletter on Integrated Control of Pathogenic Trypanosomes and their Vectors*. No.1. On line Document. Available at : <http://www.icpt.org/Newsletters/Newsletters1/newsletters1.html>.

Luckins y Dwinger, 2004. Non-tsetse-transmitted Animal Trypanosomiasis (The Trypanosomosis) *CABI Publishing*, **2**: 269-282.

Luckman SP, Hughes DE, Coxes FP, Russell RG, Rogers MJ. 1998. Nitrogen containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post –translational prenylation of GTP– binding proteins, including Ras. *JBMR* **13**: 581-589.

Luft, J. 1961. Improvements of epoxy resin embedding methods. *J. Biophys Biochem. Cytol.* **9**: 409-414.

Lun, Z-R., Fang, Y., Wang, C-J., Brun, R. 1993. Trypanosomiasis of Domestic Animals in China. *Parasitology Today*, **8**: 41-45.

Mahmoud, M.M. y Gray, A.R. 1980. Trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885 Balbiani, 1888). A review of recent research. *Trop. Anim. Health Prod.* **12**: 35-47.

Martin M.B., Grimley J.S., Lewis J.C., Heath H.T., Bailey B.N., Kendrick H., Yardley V., Caldera A., Lira R., Urbina J.A., Moreno S.N., Docampo R., Croft S.L. y Oldfield E., 2001. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. *J. Med. Chem.* **44**:10-16.

Michels, P. 1988. Compartamentation of glycolysis in trypanosomes: a potential target for new trypanocidal drugs. *Biol. of the cells.* **64**: 157-164

Molyneux, D. y Ashford, R. 1983. The Biology of *Tripanosoma* and *Leishmania* parasites of man and domestic animals. Taylor and Francis. London. pp. 153-158.

Montalvetti A., Bailey B.N., Martin M.B., Severin G.W., Oldfield E. y Docampo R., 2001. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **276**: 33-37.

Onah, D.N., Hopkins, J. y Luckins, A.G. 1998. Proliferative responses of peripheral blood leucocytes of sheep infected with *Trypanosoma evansi*. *Scand. J. Immunol.* **48**: 170-176.

Osman A.S., Jennings F.W. y Holmes P.H. 1992. Rapid development of drug resistance by *Trypanosoma evansi* in inmunosupressed mice. *Acta. Trop.* **50**:249-257.

Parra N. 2011 Análisis secretómico y proteómico de aislados de *Trypanosoma evansi* con virulencia diferencial. *Tesis Doctoral*, Departamento de postgrado en ciencias biológicas, Universidad Simón Bolívar.

Peña G. 2000. Enfermedades exóticas de los animales. Editorial Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Virginia, Estados Unidos. Pp 105-133

Perrone, T. (2003) Tipificación de aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi*. *Tesis Doctoral*, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.

Perrone, T., Fernández, D., González-Baradat, B., Eleizalde, M., González-Marcano, E. y Mendoza, M. 2009. *Trypanosoma evansi*: A comparison of PCR and parasitological diagnostic tests in experimentally infected mice. *Exp. Pathol.* **121**: 1-7.

Quiñones – Mateu, M., Finol, H.J., Sucre, L.E. y Torres, S.H. 1994. Muscular Changes in Venezuelan wild horses naturally infected with *Trypanosoma evansi*. *J. Comp. Path.* **220**: 79-89.

Raynaud J.P., Sones K.R. y Freidheim E. 1989. A review of Cymelarsan – a new treatment proposed for animal tripanosomiasis due to *T. evansi* and others trypanosomes of the *T. brucei* group. *Int. Sci. Council. Tryp. Res. Control.* **115**:334-338.

Reader E.A., Podrid P.J. y Lown B. 1985. Side effects and complications of amiodarone therapy. *Am. Heart. J.* **109**:975-983.

Reszka A.A. y Rodan G.A. 2002. Bisphosphonate mechanism of action. *Curr. Mol. Med.* **2**:5-12.

Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**: 208-212.

Rodan G.A. y Martin T.J., 2000. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*; **289**: 1508-1514.

Rodríguez, R.A., Figuera, T.M., Souza, A.L., Schild C. y Barros J. 2009. Neuropathology of Naturally Occurring *Trypanosoma evansi* Infection of Horses. *A. Vet Pathol.* **46**:251-258.

Rodriguez-Morales, A. 2005. Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad del Chagas. *Rev. Peruana de Med. Exp. y Sal.Púb.* **22**: 1726-4634.

Rosenbaum MB, Chiale PA y Halpern MS. 1976. Clinical efficacy of amiodarone as an antiarrhythmic agent. *Am. J. Cardiol.* **38**: pp. 934-44.

Rossi, M., Boada-Sucre, A., Finol, H.J., Tejero, F., Aso, A., Bello B. y Hernández, G. 1999. Ultrastructural alterations in the adrenal gland cortex of mice experimentally infected with a Venezuelan isolate of *Trypanosoma evansi*. *J. Submicrosc. Cytol.Pathol.* **31**: 509-513.

Rossi, M., Boada-Sucre, A., Hernández, G., Bello, B., Finol, H.J., Payares-Trujillo, G., y Aso, P.M. 2008. Análisis ultraestructural del hígado en ratones infectados experimentalmente con un aislado venezolano del *Trypanosoma evansi*. *Acta microsc.* **17**: 5-12.

Sanabria, A. 2011. Descripción ultraestructural y molecular del proceso de muerte celular en *Trypanosoma evansi*. T.E.G. Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Saldaña, C., Cordova, C., Ofelia, P. y Vargas, V. 2006. Utilización de *Lepidium peruvianum*, como medio de cultivo para el crecimiento de *Trypanosoma Cruzi*. *Rev. Perú Med. Exp.* **23**:137-140.

Serrano, X., García, Y., Fernández, A., Rodríguez, N., Rojas, H., Visbal, G. y Benaim, G. 2009a. Amiodarone Destabilizes Intracellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasis and Biosynthesis of Sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 1403-1410.

Serrano, X., Payares, G., De Lucca, M., Martinez, J., Mendoza-Leon, A. y Benaim, G. 2009b. Amiodarone and Miltefosine Act Synergistically against *Leishmania mexicana* and Can Induce Parasitological Cure in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:5108 – 5113.

Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. 1981. Biometry, the principles and practice of statistics in biological research. W.H. Freeman and company. San Francisco.

Solari, A.J. 1995. Mitosis and genome partition in trypanosomes. *Biocell*, **19**: 65-84.

Soulsby, E.J. 1988. The Sir Frederick Hobday Memorial Lecture. We don't shoot horses anymore. *Equine Veterinary Journal*, **20**: 243 – 248.

Sucré, X. 2011 Efecto de la simvastatina sobre la concentración de lípidos neutros de *Trypanosoma evansi* en animales experimentales. *T.E.G.* Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Taylor S. y Authié F. 2004. Pathogenesis of Animal Trypanosomiasis (The Trypanosomosis) *CABI Publishing*, **2**:331-354.

Tejero, F., Arias.Mota, L.L., Roschman-González, A., Aso, P.M. y Finol, H.J. 2010. *Trypanosoma evansi*: ultrastructural cardiac muscle and cardiac microvasculature changes in experimental murine infections. *Acta Sci. Vet.* **38**: 279-285.

Tejero, F., Brun, S., Roschman-Gonzalez, A., Velasco, E., Aso, P. M. y Finol, H. 2009a. Ultraestructura renal en infecciones murinas experimentales con un aislado venezolano de *Trypanosoma evansi*. *Rev. Inst. Nac. Hig. Rafael Rangel.* **40**: 44-49.

Tejero, F., Brun, S., Roschman-Gonzalez, A., Perrone-Carmona, T.M., Aso, P.M., Velasco, E. y Finol, H.J. 2009b. *Trypanosoma evansi*: Analysis of the ultrastructural change in hepatic cells during murine experimental infections. *Acta Microsc.* **18**: 28-32.

Tejero, F., Roschman-González, A., Perrone-Carmona, T.M. y Aso, P.M. 2008. *Trypanosoma evansi*: A quantitative approach to the understanding of the morphometry-hematology relationship throughout experimental murine infections. *J.Protozool. Res.***18**: 34-47.

Tielens, A., Van Hellemond, J. 1998. Differences in Energy Metabolism Between Trypanosomatidae. *Parasitol. Today.* **14**: 265-271.

Ting-Beall, H. 1980. Interactions of uranyl ions with lipid bilayer membranes. *J Microsc.* **118**: 221-227.

Toni M., Anda E., Pineda J, Martínez de Esteban J.P., Ollero M.D. 2009. Trastornos tiroideos por amiodarona. Editorial Navarra 32. 3. Pamplona, España. Pp 45-87

Urbina J.A. 2002. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.* **8**:287-95.

Vanhamme, L. y Pays, E. 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbial Rev.* **59**: 223–240.

Vickerman K. 1969a. The fine structure of *Trypanosoma congolese* in its bloodstream phase. *Journal of Protozoology*, **16**: 54.

Vickerman K. 1969b. On the surface coat and flagellar adhesion in Trypanosomes. *Journal of Cell Science*, **5**: 163.

Vickerman, K. 1974. The ultrastructure of pathogenic flagellates. In: Cyba Foudation Symposium 20 “Trypanosomiasis and Leishmaniasis” Elsevier, Excerpta Medical, North-Holland associated scientific publishers, Amsterdam, Holland. pp. 171-198,

Watson, M.L.1958.Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**: 475-478.

Witola W.H., Tsusa A., Inoue N., Oashi K. y Onuma M. 2005. Acquired resistance to berenil in a cloned isolate of *Trypanosoma evansi* is associated with upregulation of a novel gene, TeDR40. *J. Parasitol.* **131**:635-646.

Zhang Z.Q., Giroud C. y Baltz T. 1992. In vivo and in vitro sensitivity of *Trypanosoma evansi* end *T. equiperdum* to diminazene, suramin, MelCy, Quinapiramide, and isometamidium. *Acta. Trop.* **50**:101-110.

Zweygarth, E. y Rottcher, D. 1986. In vitro cultivation of African stocks of *Trypanosoma (trypanozoon) brucei evansi*. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **66**: 145-151.

Zweygarth E., Kaminsky R. 1990. Evaluation of arsenical compound (RM110, MeCy, Cymelasan) against susceptible and drug-resistant *Trypanosoma brucei brucei* and *T. evansi*. *Trop. Med. Parasitol.* **41**:208-212.