



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

**ACCION DEL DIAZEPAM SOBRE LA BIOLOGIA CELULAR de
Leishmania mexicana (Cepa NR) y *Trypanosoma cruzi* (Cepa
BIOMED).**

Trabajo Especial de Grado presentado
ante la ilustre Universidad Central de
Venezuela por la Br **Nesbith Samanta
Castro Wicttorff** como requisito parcial
para optar por el titulo de Licenciada en
Biología.

Tutor (a): **Francehulli Dagger Boyer**

CARACAS – VENEZUELA

Febrero del 2012

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "**Acción del diazepam Sobre la Biología Celular de *Leishmania mexicana* (Cepa NR) y *Trypanosoma cruzi* (Cepa BIOMED)**". Presentado por la Br. Nesbith Samanta Castro Wicttorff, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra casa Magna de Estudios para optar por el título de Licenciada en Biología.

Dra. Francehuli Dagger Boyer

TUTORA

Dra. Leidy Herrera

JURADO

Dra. Concepción Hernández

JURADO

A mi **Madre Flor Beatriz Wicttorff**, por sus enseñanzas, que son la base de mi perseverancia para el logro de esta meta, a mis **hijos Marckwell Samuel Contreras y Jean Marcos Samuel Contreras**, por su paciencia por mi dedicación a mi formación profesional, a mis hermanas **Ninoska Castro y Jannette Castro**, que ante cualquier adversidad que hemos vivido he contado con ellas en todo momento, los amo.

INDICE GENERAL

<i>Dedicatoria</i>	III
Índice de figuras.....	VIII
Agradecimientos.....	XV
<i>Abreviaturas</i>	XX
<i>Resumen</i>	XXI
1. Introducción	1
1.1 Leishmaniasis.....	2
1.2 Distribución geográfica.....	3
1.3 Taxonomía.....	7
1.4 Ciclo de vida.....	9
1.5 Tripanosomiasis Americana.....	11
1.6 Distribución geográfica.....	12
1.7 Paninfectividad de T. cruzi	15
1.8 Taxonomía.....	16
1.9 Ciclo de vida.....	17
2. Antecedentes	20
2.1 Diazepam.....	25
3. Objetivos	32
3.1 Objetivo General.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4. Materiales y Métodos	33
4.1 Parásitos.....	33
4.2 Cultivo de Líneas celulares.....	34
4.2.1 Células Vero.....	34

4.2.2 La línea de Macrófagos J774.....	35
4.3 Metodologías.....	36
4.3.1 Efecto del Diazepam sobre la proliferación de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> y epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	36
4.3.2 Procesamiento de los promastigotes y epimastigotes para microscopía electrónica de transmisión.....	36
4.3.3 Ensayo de citotoxicidad del Diazepam sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i> , epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , macrófagos J774 y células Vero. Determinación del IC ₅₀	37
4.3.4 Efecto del Diazepam sobre amastigotes de <i>L. mexicana</i> en macrófagos J774. G8.....	39
4.3.5 Estimación cualitativa del potencial eléctrico transmembrana mitocondrial en promastigotes de <i>L. mexicana</i>	44
4.3.6 Efecto del Diazepam sobre el proceso de diferenciación celular en <i>L. mexicana</i>	45
4.4 Medios.....	47
4.4.1 Medio LIT.....	47
4.4.2 Medio Shneider.....	48
4.4.3 Medio RPMI.....	49
4.4.4 Medio DMEN.....	49

5. Resultados.....	51
5.1 Curva de crecimiento de promastigotes de <i>L. mexicana</i> en medio Shneider.....	52
5.2 Efecto del Diazepam sobre la proliferación de los promastigotes de <i>L. mexicana</i>	53
5.3 Efecto del Diazepam sobre la morfología de los promastigotes de <i>L. mexicana</i>	54
5.4 Ensayo de citotoxicidad del Diazepam sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i> . Determinación de CI_{50}	58
5.5 Citotoxicidad del Diazepam sobre la línea de macrófagos J774. Determinación del CI_{50}	60
5.6 Efecto del Diazepam sobre el proceso de infección de <i>L. mexicana</i> en macrófagos de la línea J774.....	62
5.7 Actividad del Diazepam sobre los amastigotes de <i>L. mexicana</i> en macrófagos de la línea J744.....	64
5.8 Efecto del Diazepam sobre el proceso de diferenciación en <i>L. mexicana</i>	67
5.9 Estimación cualitativa del potencial transmembrana mitocondrial con Rodamina 123 en promastigotes de <i>L. mexicana</i>	71

5.10 Efecto del Diazepam sobre la ultra estructura de los promastigotes de <i>L. mexicana</i>	74
5.11 Curva de crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> en medio LIT.....	82
5.12 Efecto del Diazepam sobre la proliferación de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	84
5.13 Efecto del Diazepam sobre la morfología de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i> (cepa Y).....	85
5.14 Citotoxicidad del Diazepam sobre las células Vero. Determinación del CI_{50}	88
6. <i>Discusión</i>	90
7. <i>Conclusiones</i>	95
8. <i>Bibliografía</i>	97

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución geográfica de la Leishmaniasis tegumentaria americana en Venezuela, basada en los casos reportados al M.S.D.S. entre 1955 y 1987 (área punteada), y de sus agentes causales (Bonfante y Barroeta, 2002).....	5
Figura 2: Distribución geográfica de los focos de leishmaniasis visceral americana en Venezuela. (Bonfante y Barroeta, 2002).....	6
Figura 3. Sistemática del género <i>Leishmania</i> . 1. <i>Leishmania</i> del viejo Mundo. 2. <i>Leishmania</i> del Nuevo Mundo. 3. Es indistinguible de <i>L. (V) braziliensis</i> por análisis RLFP. 4. Reconocidas como nuevas especies en el subgénero <i>Vianna</i> . * Término sin estatus taxonómico. ** No reportadas en el hombre. [Tomado de Mendoza-León y col., 1996].....	8
Figura 4. Representación esquemática del ciclo de vida de <i>Leishmania sp</i> , en el Hospedador humano. (Tomado en http://www.dpd.cdc.gov/dpdx . El 4/04/2010].....	9
Figura 5. Distribución geográfica de la Tripanosomiasis americana en América. http://medicina.ufm.edu/cms/es/Enfermedad-de-Chagas [Consulta: 04 de marzo del 2010].....	13
Figura 6. Ciclo de vida del <i>Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi</i> . http://www.dpd.cdc.gov/dpdx . [Consulta: 04 de marzo del 2010].....	18

Figura 7. Drogas empleadas en el tratamiento de la Leishmaniasis.....	22
Figura 8. Estructura molecular del diazepam (7- cloro-1,3- dihidro-1- metil-5- fenil- 2H- 1,4- benzodiazepina-2- ona) [Tomado de: Hernández, 1996].....	26
Figura 9: El receptor GABA-A. a. El receptor GABA-A esta íntimamente acoplado a canales selectivos del ion cloro, en contraste a otros receptores. b. El complejo canal- receptor GABA-A, posee sitios de unión para barbituratos y benzodiazepinas, que pueden incrementar marcadamente la respuesta hiperpolarizante a GABA (Levitan y Laezmarek, L. 2002).....	28
Figura 10. Representación esquemática el proceso metabólico del MTT.....	37
Figura 11. Visualización de un ensayo con el MTT.....	38
Figura 12. Curva de crecimiento de promastigotes de <i>L. mexicana</i> en medio Schneider suplementado con 10% SFB.....	52
Figura 13. Acción antiproliferativa del Diazepam sobre los promastigotes de <i>L. mexicana</i> (cepa NR).....	54
Figura 14. Curva dosis respuesta a las diferentes concentraciones del Diazepam a las 48 horas de incubación. Determinación del CI ₅₀	55

Figura 15. Cambios en la morfología de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> (cepa NR) tratadas con Diazepam a una concentración de 45µg/ml a las 48 horas de incubación. A) Promastigotes control. 400X. B) Tratadas con 45µg/ml de Diazepam 400X.....	57
Figura 16. Representación gráfica de la citotoxicidad del Diazepam sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i> a las 48 horas de incubación, Ensayo con el MTT.....	59
Figura 17. Representación gráfica de la citotoxicidad del Diazepam sobre macrófagos línea J774 a las 48 horas de incubación mediante el MTT.....	61
Figura 18. Efecto del Diazepam a diferentes concentraciones sobre el proceso de Infección de los macrófagos.....	62
Figura 19. Efecto del tratamiento previo de los promastigotes con Diazepam sobre el proceso de Infección de los macrófagos.....	63
Figura 20. Efecto del Diazepam sobre amastigotes de <i>L. mexicana</i> internalizados en macrófagos de la línea J744. G8.....	65
Figura 21. A Infección de los macrófagos con promastigotes de <i>L. mexicana</i> simultáneamente con el Diazepam. a. Macrófagos sin infectar; b Diazepam 35 µg/ml; c Diazepam 45 µg/ml; d Diazepam 75 µg/ml. B Tratamiento de los macrófagos infectados con Diazepam. a Macrófagos	

sin infectar; **b** Macrófagos con Diazepam 45 µg/ml y **c** Macrófagos con Diazepam 75 µg/ml. Las flechas indican los amastigotes dentro del macrófago..... 66

Figura 22. Transformación de la forma promastigote a la forma amastigote a 34°C. **a)** Transformación de las células control, **b)** Transformación de promastigotes tratados con Diazepam a 20 µg/ml, **c)** Transformación de promastigotes tratados con Diazepam a 36 µg/ml..... 69

Figura 23. Efecto del Diazepam sobre el proceso de diferenciación de la forma promastigote a la forma amastigote de *L. mexicana*. **A)** Promastigotes control, **B)** Promastigotes tratados con Diazepam 45 µg/ml..... 70

Figura 24. Promastigotes de *L. mexicana* control, tratados con rodamina 123; (400X).....72

Figura 25. Promastigotes de *L. mexicana* incubados con Diazepam a 45 ug/ml por 48 horas y tratados con Rodamina 123. (400X)..... 73

Figura 26 a. Corte longitudinal de promastigotes sin tratamiento. Se observa el núcleo (N) típicamente presenta un nucleolo (n) electrodenso, ácidocalcisomas (A), la mitocondria (Mit), el Kinetoplasto (Kt), el flagelo (f) y la bolsa flagelar (bf)..... 75

Figura 26 b. Micrografía panorámica de promastigotes tratados con Diazepam a 45µg/ml por 48 horas. Las células de formas esféricas u ovaladas, el núcleo (N) no presentaron alteraciones visibles y se observa un solo núcleo, la mitocondria (Mit) se observa alterada, así como la bolsa flagelar (bf) contiene material vesicular, con la presencia hasta de hasta 2 flagelos (f)..... 76

Figura 26 c. Micrografía de promastigotes tratados con Diazepam a 45 µg/ml por 48 horas, se aprecia un solo núcleo (N), el Kinetoplasto (Kt) intacto y se pudo evidenciar el cuerpo basal (cb) y la bolsa flagelar (bf).Nótese la pérdida de conexión entre la bolsa flagelar y el mitocondrion conteniendo el Kt..... 77

Figura 26 d. Micrografía de un promastigote tratado con Diazepam a 45 µg/ml por 48 horas. Promastigote de forma ovalada, se observó el Kinetoplasto (Kt) y se pudo evidenciar que al mitocondrion (Mit) con una vesícula en el interior, el cuerpo basal (cb) y la bolsa flagelar (bf) con material vesicular y un solo flagelo (f)..... 78

Figura 26 e. Micrografía de una célula tratada con Diazepam a 45 µg/ml por 48 horas, promastigote de forma ovalada, se observó el Kinetoplasto (Kt) y la mitocondria (Mit) presentó alteraciones, forma reticular y estructura en forma de vesícula en su interior, dos flagelos (f), el cuerpo basal (cb) y la bolsa flagelar (bf)..... 79

Figura 26 f. Micrografía de un promastigote tratado con Diazepam a 45 µg/ml por 48 horas, se aprecia promastigote de forma ovalada, el Kinetoplasto (Kt), el mitocondrion (Mit) presentó arreglos en forma de vesículas en su interior, el cuerpo basal (cb) con alteraciones en su arreglo interno y bolsa flagelar dilatada (bf) con vesículas.....	80
Figura 26 g. Micrografía de una célula tratada con Diazepam a 45 µg/ml por 48 horas. Promastigote de forma ovalada, se observa separación del mitocondrion conteniendo el Kinetoplasto (Kt), la mitocondria (Mit) presenta crestas en forma de retículos .Cuerpo basal (cb) y el flagelo (f) con alteraciones severas.....	81
Figura 27. Curva de crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> en medio Lit suplementado con 10% SFB. A. Cepa Biomed; B. Cepa Y.....	83
Figura 28. Acción antiproliferativa del Diazepam sobre los epimastigotes de <i>T. cruzi</i> . A. Cepa Biomed, B. Cepa Y.....	85
Figura 29. Curva dosis respuesta a las diferentes concentraciones del Diazepam a las 48 horas de incubación. Determinación del CI ₅₀ mediante el programa Sigmaplot. A. Cepa Biomed, B. Cepa Y.....	86
Figura 30. Morfología de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) tratados con Diazepam a una concentración de 45µg/ml a las 48 horas de incubación. A) Promastigotes control 400X. B) Tratadas con Diazepam a 45µg/ml. 400X.....	87

Figura 31. Representación gráfica de la citotoxicidad del Diazepam sobre células Vero a las 48 horas de incubación mediante el MTT..... 89

AGRADECIMIENTOS

Ante todo **a Dios Todopoderoso**, por darme las fuerzas necesarias y guiarme espiritualmente para obtener este logro.

A mi madre **Flor Beatriz Wicttorff Lucero de Castro**, por ser la mejor madre del mundo, por sus enseñanzas, su comprensión, por el apoyo que en vida me dio, aun cuando ya no está, se que este logro es motivo de orgullo para ella y que siempre me apoyara en el camino que yo decida tomar para mi crecimiento personal y profesional.

A mi padre **Domingo Antonio Castro Arrayago**, por darnos ese ejemplo de padre protector y pilar de la familia, por siempre estar a mi lado y apoyarme en vida, y se que también para él es un orgullo este logro.

A mis hijos, **Marckwell Samuel Contreras Castro y Jean Marcos Samuel Contreras Castro**, por haber tenido paciencia, por creer en mí, por apoyarme y comprender que mis esfuerzos y mis logros son para ellos y que de alguna manera sea ejemplo, en que sin importar las adversidades, las metas trazadas y que aman se pueden alcanzar con perseverancia y constancia.

A mis hermanas **Jannette Nathalie Castro Wicttorff y Ninoska Castro Wicttorff**, a quienes amo y le agradezco mucho, por quererme proteger y guiar, especialmente a Ninoska ya que es la responsable de que yo tenga unos hijos maravillosos, estudiosos y educados, por su dedicación a ellos

desde la partida lamentable de nuestra madre, para que yo no abandonara mi meta, las amo y se que ellas quieren lo mejor para mi.

A mi hermana **Noelia Castro Wicttorff**, que aunque ya no está, siempre la extraño, por ser mi mejor amiga.

A **Solange Barreto** mi hermana del Alma por ser mi apoyo durante el transcurso de mi carrera, por escucharme, por ayudarme, por tenderme la mano desinteresadamente y por todos los momentos que hemos compartido y por los que vendrán, la adoro, la amo y la admiro por ser un ejemplo de mujer luchadora.

A **Karla Yépez**, mi hija, mi hermana y sobre todo mi mejor amiga, quien estuvo en momentos difíciles de mi vida apoyándome y ayudándome, con la que cuento en las buenas y en las malas y a la que le tengo mucho que agradecer, la quiero y la amo mucho, a su mama, mi mamá Nancy Yépez, una mujer luchadora y amorosa, que quiero, admiro y respeto.

A mi Ex esposo **Jean Marcos Contreras** que siempre fue mi compañero y mi apoyo, el hombre que ame, el padre de mis hijos, destaco que la mayor parte e importante de este logro es gracias a él, por la amistad que nos queda, por el cariño, por el aprecio que siempre le tendré, que Dios lo bendiga, lo cuide y lo guíe.

A mi tutora la Dra. **Francehulli Dagger Boyer**, por ser una gran mujer, una persona excepcional y extraordinaria, que quiero, admiro y respeto, a la cual

le tengo mucho que agradecer, que van mas allá de su excelente trabajo como mi formadora en la etapa de adiestramiento profesional, que no solo me enseñó a resolver problemas en el trabajo diario a superar adversidades que se presentan en el laboratorio, aun cuando los recursos son limitados, o a generar ideas productivas para el mismo, sino que también he contado con ella en estos cuatro años que tengo bajo su tutela en las buenas y en las malas de mi vida profesional y personal, la cual tendrá mi eterno agradecimiento, mi cariño y mi admiración. **Gracias profe.**

A la Dra. **Elizabeth Valdivieso** por abrirme las puertas del laboratorio de Biología Celular de Parásitos y permitirme formar parte del grupo de trabajo, por ser una mujer con entereza, con quien he contado en muchos aspectos y por sus palabras alentadoras en momentos difíciles.

Al profesor **Henry Román**, quien me enseñó el manejo del laboratorio y de muchas técnicas esenciales para la realización de los trabajos que realizamos, y aun cuando ya no forma parte del equipo del laboratorio conté con él cuando tuve alguna emergencia.

A **Felipe Sojo**, como le digo mi negro querido, por su paciencia por las miles de veces que lo moleste, por nunca decirme que no, por contar con él incondicionalmente innumerables veces, las cuales estuvo para enseñarme y auxiliarme, con paciencia, lo quiero y admiro mucho.

A mi Ami **Yirsie Gabriela Solorzanó**, quien me acompañó los últimos años de la carrera y me hacía compañía cuando tenía que dedicarle horas y días fuera del horario, con quien cuento, por ser una amiga extraordinaria y excepcional, la quiero mucho; Mi ami **Vanessa Medina** mi comadre, una persona carismática, confiable, y maravillosa, gracias por compartir conmigo y ser mis amigas, las quiero.

A **Ramón Olivier Brito** mi siempre amigo y hoy en día mi pareja, quien ha sido confidente, apoyo y con quien he contado incondicionalmente en las buenas y no tan buenas desde hace varios años, a quien siempre he adorado, respetado, admirado, te amo bobis, motivo de alegría en mi vida, llenándome de bendiciones, padre del bebe con el que Dios nos ha bendecido y estoy gestando y a su Familia Olivier Brito por darme su cariño y apoyo en tan poco tiempo, Dios los Bendiga.

Un especial agradecimiento a Profesoras con las que he contado y formaron parte no solo de este trabajo de alguna manera y con las que he contado en el ámbito personal y profesional, mis profes queridas, **Valentina Salas, Herlinda Ramos, Leydi Herrera, Vincenza de Cervino y Carmen Marrero.**

A la **Dra Noris Rodrigues y Dra Andrea Orúe** del Laboratorio de Ingeniería Genética, a la **Dra Morela Rodrigues** del Laboratorio de Virología y la **Dra Primavera Alvarado** del Laboratorio de Micología, pertenecientes al Intituto de Biomedicina de la Universidad Central de Venezuela, gracias por su

colaboración y apoyo para la culminación de este trabajo, por haberme abierto las puertas de sus laboratorios y permitirme formar parte de ellos.

A la **Familia Magallanes**, que formaron parte especial en mi vida y tendrán un lugar especial en mi corazón y un eterno agradecimiento por su apoyo en todo momento, en especial las Hermanas **Colmenares Magallanes**, Lorena y Marielena, a su mamá Argelis (Tía Valle), a **Williams Hernández Magallanes** que en el tiempo que compartimos me apoyo en la elaboración de este trabajo, a sus **hijos Daniela y Dennys** que se adueñaron de mi corazón, a Mryuri Hernandez Magallanes, amiga confidente excelente persona y ejemplo de gran mujer, a **Mauro Di Genaro y Evelia Manzo** que me dieron aliento en momentos difíciles, a mi abuelita **Flor Magallanes** por darme su cariño y **Milagros Magallanes**, con quien he contado desde hace varios años, como amiga y apoyo, Gracias a todos y Dios los Bendiga

GRACIAS DIOS ¡

ABREVIATURAS

Ácido Clorhídrico (HCL)

Ácido gamma aminobutírico (GABA)

Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)

Buffer Fosfato Salino (PBS)

Concentración inhibitoria en el crecimiento del 50% de la población (CI_{50})

Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)

Dubelcco medio Eagle modificado (DMEM)

Hidroxido de sodio (NaOH)

Leishmaniasis cutánea (LC)

Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)

Leishmaniasis mucocutánea (LCM)

Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)

Leishmaniasis Tegumentaria americana (LTA)

Leishmaniasis visceral (LV)

MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol 1-2-y1)-2,5-difeniltetrazol)

Suero Fetal Bovino (SFB)

Tetroxido de Osmio (OsO_4)

RESUMEN

En los tripanosomatideos se encuentran dos géneros de protozoarios *Leishmania* y *Trypanosoma* causantes de severas patologías al hombre y animales domésticos, generando las parasitosis conocidas como *Leishmaniasis* y *Tripanosomiasis*. Numerosas investigaciones a nivel mundial están dedicadas a la búsqueda de drogas alternativas para estas parasitosis, partiendo del estudio profundo de diferentes aspectos del metabolismo, ciclo celular, componentes estructurales del citoesqueleto y aspectos bioquímicos del parásito. En nuestro laboratorio se ha iniciado desde hace algunos años, la búsqueda de drogas alternativas para el tratamiento de estas enfermedades, realizando ensayos con compuestos comúnmente usados en humanos para el tratamiento de ciertas afecciones del Sistema Nervioso Central, de los cuales se haya reportado una acción sobre una actividad en particular importante en diferentes tipos celulares. En este trabajo el compuesto seleccionado fue el Diazepam. El objetivo fue determinar la acción del Diazepam sobre la biología celular de promastigotes de *Leishmania mexicana* (cepa NR) y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa Biomed). Se encontró que el Diazepam inhibe la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* de manera dosis dependiente de la concentración con un CI_{50} entre 27,98 y 36,25 $\mu\text{g/ml}$, induciendo cambios en la morfología del parásito a las 24 horas a partir de los 30 $\mu\text{g/ml}$. Se evidencian cambios de forma, de alargada a elipsoidal o redondeada, bloqueo de la división celular a nivel del cuerpo basal, bloqueándose su separación, degeneración flagelar y alteraciones internas en las crestas mitocondriales. Nos planteamos, a partir de los estudios de ultraestructura, que el posible sitio de acción de la droga sea el cuerpo basal o el material filamentoso, posiblemente actina o filamentos intermedios, que conectan el cuerpo basal y la membrana anterior del mitocondrion que limita al Kinetoplasto. El Diazepam disminuye el porcentaje de infección de los amastigotes dentro de los macrófagos J774 en un 35 % a 45 $\mu\text{g/ml}$ y hasta en un 15% la capacidad de infección a concentraciones de 90 $\mu\text{g/ml}$. Estos hallazgos nos plantean futuras pruebas a realizar en el sistema murino. Resultados preliminares utilizando epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, nos indican que el Diazepam inhibe su proliferación, de manera dosis dependiente de la concentración, mostrando un CI_{50} de 44,05 $\mu\text{g/ml}$.

1. Introducción

En los tripanosomatideos se encuentran dos de los géneros de protozoarios causantes de severas patologías en el hombre y animales domésticos, como lo son *Leishmania sp.* y *Trypanosoma sp.* Estos organismos parecen haberse separado de la línea eucariota principal, antes de la divergencia de plantas, animales y hongos y presentan características no encontradas en organismos superiores. Estas propiedades únicas pueden ser el resultado de la conservación de mecanismos primitivos o de una evolución divergente (Bard, 1989).

Estos parásitos están caracterizados por la presencia de un solo flagelo y un mitocondrion, dentro del cual se encuentra un genoma ordenado en una compleja y compacta red denominada kinetoplasto. Ambos parásitos tienen estadíos intracelulares, con ciclos de vida que involucran vertebrados e invertebrados. Son causantes de parasitosis que afectan un porcentaje significativo de la población humana de las regiones tropicales y subtropicales del mundo después de la malaria (Bonfante y Barroeta ,2002).

El incremento de las poblaciones humanas y las presiones económicas ha conducido a la colonización de zonas rurales a nivel mundial, aumentando los factores de riesgo tanto para el hombre como para los animales domésticos, de contraer enfermedades zoonóticas propias de animales

silvestres o que están restringidas a éstos, las cuales poseen condiciones zoogeográficas peculiares, generalmente zonas poco intervenidas y colonizadas por el hombre (Herrera y Urdaneta-Morales, 2001).

Algunas de estas zoonosis presentan una localización focal o nido; concepto descrito en la teoría de la nidalidad natural de las parasitosis, la cual enuncia que los focos enzoóticos silvestres de muchas enfermedades, existen en la naturaleza sin comprometer al hombre y a sus animales domésticos (Pifano, 1973).

Estos focos presentan condiciones ecológicas bien definidas donde los agentes patógenos y sus hospedadores naturales están asociados frecuentemente, a través de un hospedador intermediario y/o un vector. Existen diversos factores bióticos y abióticos como el clima, suelo, vegetación, fauna, entre otros, los cuales condicionan a estas asociaciones ecológicas, cuya presencia sirven como un potencial indicador de su existencia (Pifano, 1973).

1.1 Leishmaniasis.

La leishmaniasis es una zooantroponosis causada por diferentes especies del género *Leishmania sp.*, el cual debe su nombre a W. B. Leishman, quien fue uno de los primeros en asociar al organismo con síntomas iniciales de la enfermedad. Estos parásitos son transmitidos principalmente por insectos dípteros hematófagos de la familia Psychodidae, los vectores de interés

epidemiológico son del género *Phlebotomus sp.* (Viejo mundo) y *Lutzomyia sp.* (Nuevo mundo). La infección con *Leishmania* ocurre cuando un insecto hembra pica a un hospedador infectado, ingiriendo formas microflageladas (amastigotes), los cuales se transforman rápidamente en el intestino medio del vector en células flageladas (promastigotes), siendo inoculadas a otro hospedador en el momento de una nueva picadura. El parásito toma 10 días aproximadamente para ser infectante y se requiere que los vectores piquen repetidas veces para una transmisión adecuada (Molyneux, 1987).

En el humano estos parásitos generan un amplio espectro de manifestaciones clínicas, las cuales se han asociado tanto a la especie de *Leishmania* que causa la infección, como a la respuesta inmunológica del hospedador vertebrado, reconociéndose dos formas clínicas principales de la enfermedad, la leishmaniasis cutánea (LC) y la leishmaniasis visceral (LV) la cual si no es tratada a tiempo conlleva a la muerte del individuo. Ataca primordialmente a infantes menores de 10 años de edad generando hepatopleganomegalia, fiebre alta, anemia, vomito y pérdida de peso, pero también puede ocurrir en adolescentes y adultos. Esta infección tiene una alta tasa de mortalidad y muestra complicaciones con infecciones secundarias (Rondon, 1993). La LC se presenta a su vez en varias formas clínicas. La leishmaniasis cutánea localizada (LCL) caracterizada por lesiones localizadas, la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) presenta lesiones dispersas por la piel y en la leishmaniasis mucocutánea (LCM) las lesiones

están presentes en la zona nasomucofaringea. (Rondon, 1993; Convit y Pinardi, 1972; Convit y Pinardi, 1974)

En Venezuela, esta eparasitosis está ampliamente distribuida en todos los estados, siendo el estado Nueva Esparta una zona endémica para la forma visceral de la enfermedad, no se reportan casos de LC (Zerpa y col., 2002) La LC es endémica en todos los estados del país, con excepción de Delta Amacuro, donde aún no ha sido reportada (Fig. 1). Entre 1955 y 1991 fue registrado por el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social un total de 30.645 casos, con un promedio de 2,065 por año. Esta enfermedad tiene una prevalencia aproximada de 12,3 por 100.000 habitantes, siendo la más alta en los estados Lara, Trujillo, Mérida, Táchira, Sucre, Anzoátegui, Cojedes, Miranda y Yaracuy (Bonfante y Barroeta, 2002). En nuestro país la LC está asociada a dos especies del parásito, siendo predominante *L. brazilensis* con respecto a *L. mexicana* (Rodriguez y col., 2001). Entre sus hospedadores vertebrados primarios están animales como ratas, zorros, mapaches, perezas, osos hormigueros, marsupiales y como secundarios se encuentran el hombre, el perro y el burro; todos forman parte de su ciclo de vida primario o accidental como es el caso de los hospederos secundarios, al penetrar en los focos naturales de transmisión (Belford y Botto, 2000) .

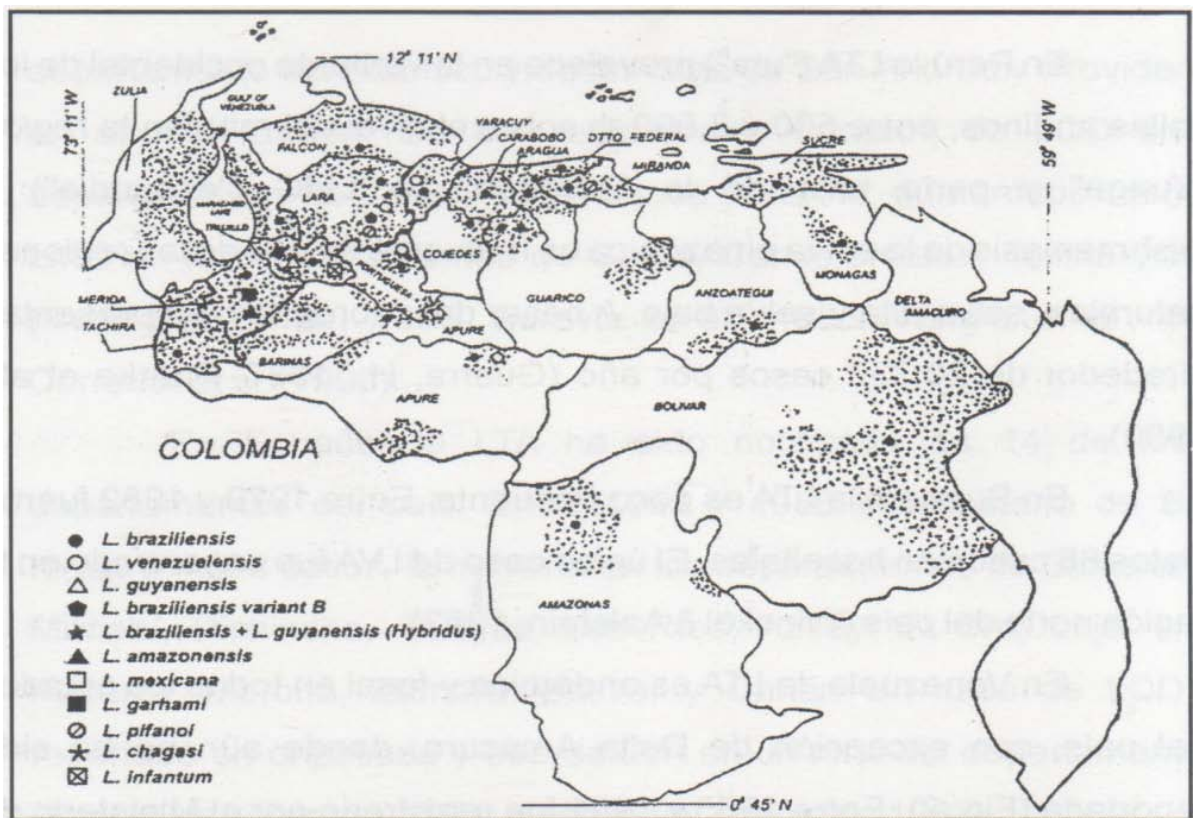


Figura 1. Distribución geográfica de la Leishmaniasis tegumentaria americana en Venezuela, basada en los casos reportados al M.S.D.S. entre 1955 y 1987 (área punteada), y de sus agentes causales (Bonfante y Barroeta, 2002).

La LV es esencialmente focal y se presenta de forma esporádica como pequeños brotes epidémicos distribuida en gran parte del país. El Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS) ha registrado un poco más de 800 casos, la mayoría procedente de los estados Guárico, Bolívar, Carabobo, Lara, Falcón, Zulia, Barinas, Portuguesa, Aragua, Distrito Capital, Yaracuy, Monagas y Nueva Esparta (Fig. 2), (Bonfante y Barroeta, 2002). La

enfermedad se observa preferentemente en países tropicales, en pequeños focos que se asientan en los piedemontes o faldas de serranías con densa vegetación, así como también en valles cubiertos de formación herbácea, generalmente en las inmediaciones de ríos y quebradas (Pifano,1973).

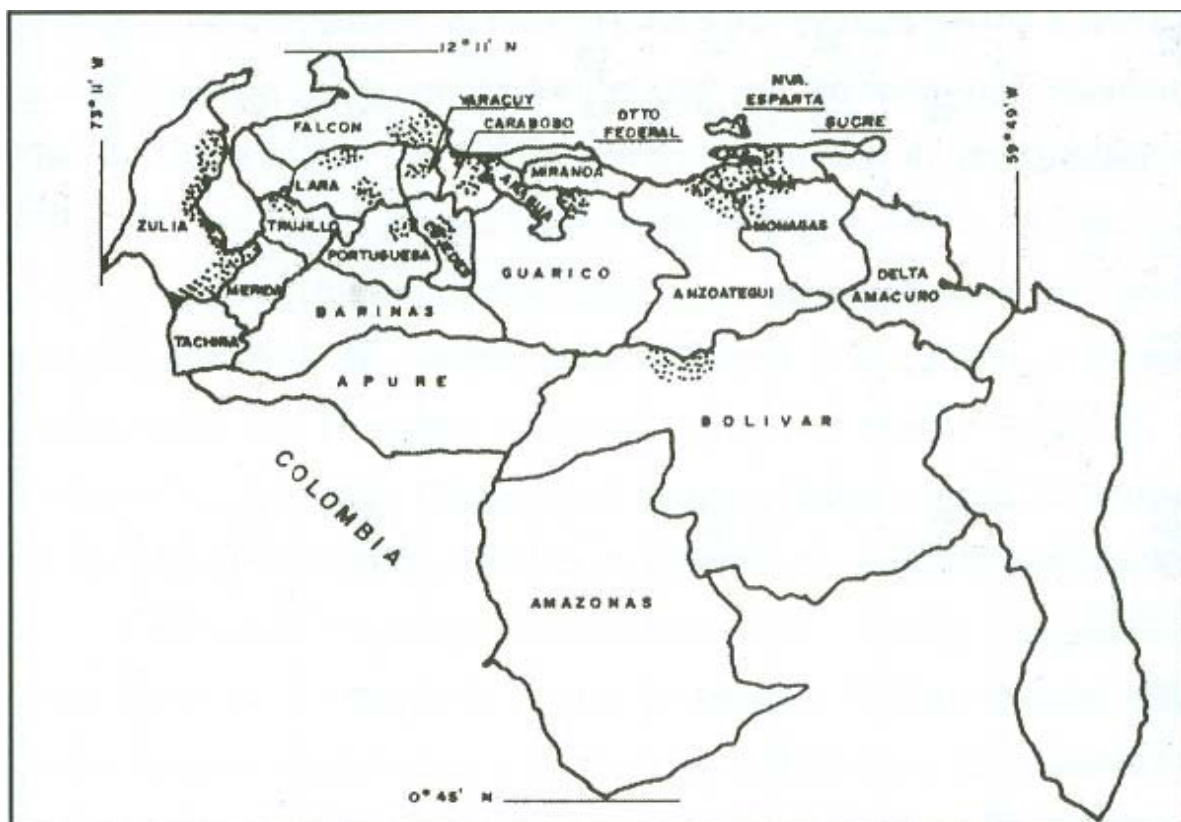


Figura 2. Distribución geográfica de los focos de leishmaniasis visceral americana en Venezuela. (Bonfante y Barroeta, 2002).

1.1.1 Taxonomía

Leishmania pertenece al Subreino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Orden Kinetoplastida y Familia Tripanosomatidae (Fig. 3). El género *Leishmania* ha sido clasificado en dos subgéneros *Leishmania* (*Leishmania*) y *Leishmania* (*Vianna*), basándose en el desarrollo del parásito en el tracto digestivo del insecto vector. El sitio donde se desarrolla el parásito varía entre los diferentes grupos de *Leishmania*, y está relacionada con la micromorfología y bioquímica del intestino el flebótomo. Esta relación ha permitido emplear la localización de los parásitos en el intestino (píloro) para clasificar *Leishmania* en los tres grupos siguientes: suprapilaria, en el cual todo el desarrollo del parásito ocurre en el intestino medio antes de migrar hacia las piezas bucales y su consiguiente transmisión por la picadura del insecto, característico del subgénero *Leishmania*; peripilaria, en el cual el desarrollo inicial del parásito ocurre en el intestino posterior, con subsiguiente transmisión por la acción de la picadura del vector. Se incluyen en este grupo el subgénero *Vianna*; hipopilaria, en el cual el desarrollo ocurre únicamente en el intestino posterior del vector y la transmisión ocurre por la ingesta del vector infectado, en este grupo se incluyen el género *Saureoleishmania* (Lainson y Shaw, 1987).

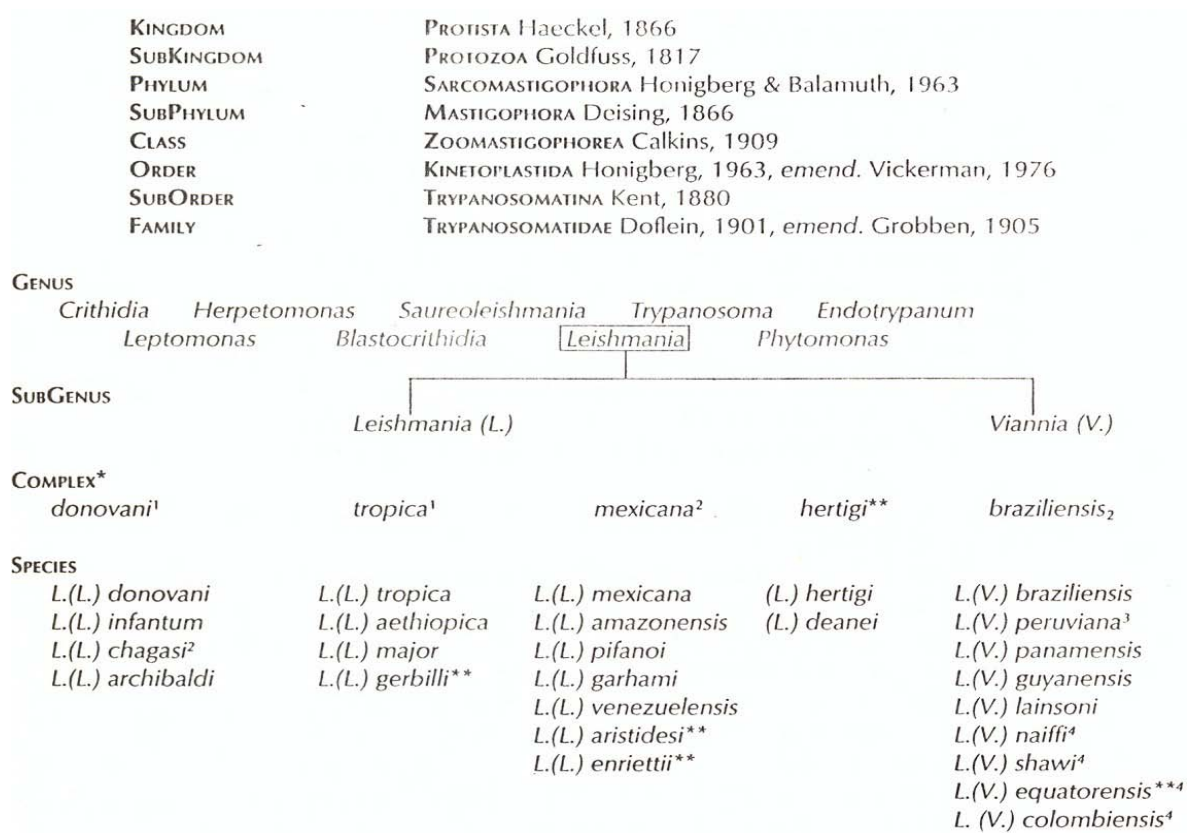


Figura 3. Sistemática del género *Leishmania*. **1.** *Leishmania* del viejo Mundo.

2. *Leishmania* del Nuevo Mundo. **3.** Es indistinguible de *L. (V) braziliensis* por

análisis RLFP. **4.** Reconocidas como nuevas especies en el subgénero

Vianna. * Término sin estatus taxonómico. ** No reportadas en el hombre.

[Tomado de Mendoza-León y col., 1996]

1.1.2 Ciclo de Vida

Leishmania presenta un ciclo de vida heteroxénico, donde participa un hospedador invertebrado que hace las veces de vector y un hospedador vertebrado que puede ser natural o circunstancial como en el caso de los hospedadores secundarios (Fig. 4). Los parásitos de las especies de *Leishmania* existen en la forma de promastigotes en el insecto vector y amastigotes en los macrófagos del hospedador vertebrado (Molyneux, 1987).

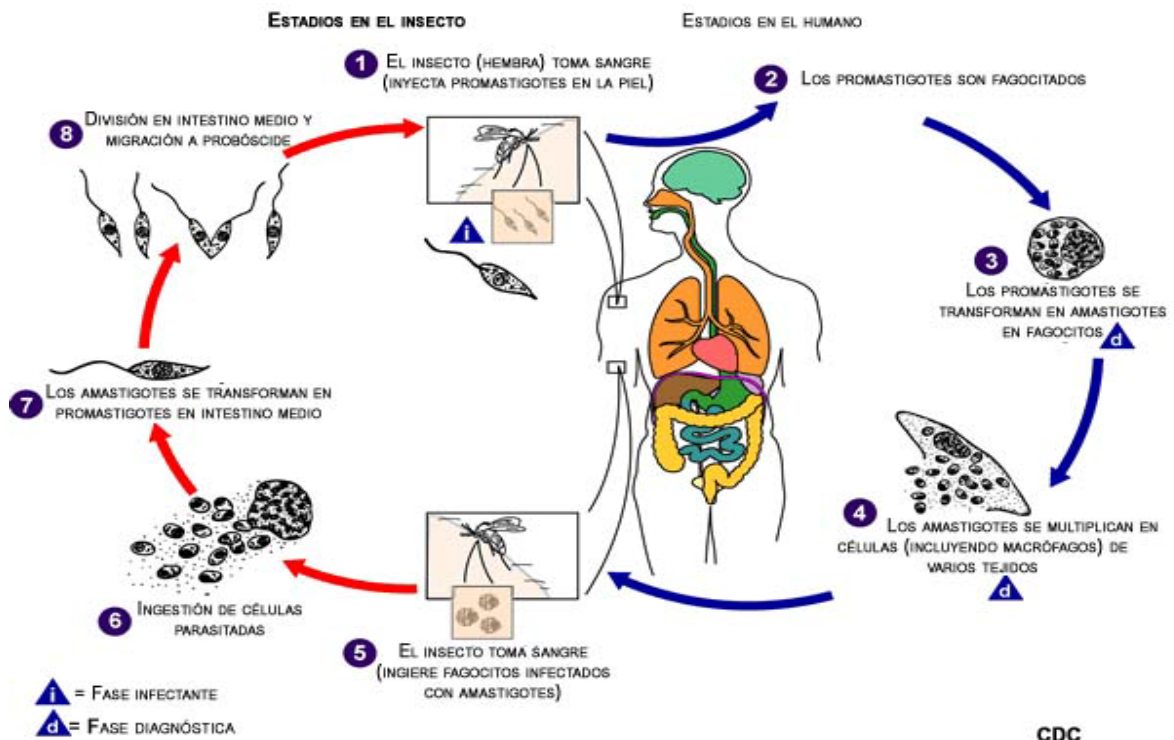


Figura 4. Representación esquemática del ciclo de vida de *Leishmania* sp, en el Hospedador humano. (Tomado en <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>. El 4/04/2010]

Los promastigotes tienen un flagelo, se caracterizan por ser mótils y de forma alargada con un kinetoplasto en posición posterior, mientras que los amastigotes carecen de flagelo y se caracterizan por su forma esférica, siendo intracelulares obligatorios ya que se desarrollan en los macrófagos del hospedador vertebrado, específicamente dentro de una vacuola parasitófora o fagolisosoma (Molyneux, 1987). Los amastigotes son ingeridos por el insecto vector, en la toma de sangre a un hospedador vertebrado infectado. Una vez dentro del insecto migran hasta el estómago (sección Suprapylaria), donde se transforman y se multiplican en promastigotes. Los promastigotes durante su tránsito por el tracto digestivo del insecto sufren un proceso de “metaciclogénesis” transformándose en promastigotes metacíclicos, forma altamente infecciosa para los mamíferos. Estos promastigotes, son inoculados en la dermis del mamífero, donde se transforman a amastigotes luego de ser fagocitados por los macrófagos donde se multiplican. La diseminación ocurre cuando los macrófagos se lisan liberando amastigotes que infectan macrófagos adyacentes no infectados (Bonfante y Barroeta, 2002).

1.2 Tripanosomiasis Americana.

La tripanosomiasis americana es una de las enfermedades con modelo de zoonosis, que constituye una biogeocenosis localizada dentro de un paisaje geográficamente definido (Pifano, 1973), es propia de animales silvestres, varios de ellos tan antiguos como el continente americano (marsupiales, edentados y caviomorfos); esta enfermedad ha sido transmitida al hombre y sus animales domésticos, en forma secundaria, debido a la colonización de áreas endémicas silvestres. Esta parasitosis es transmitida por más de cien especies de insectos hematófagos estrictos, los cuales actúan como vectores biológicos del orden Hemiptera, Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae, siendo *Rhodnius prolixus*, *Pastrongylus geniculatus* y *Triatoma maculata* en orden de importancia, los más relevantes para Venezuela (Pifano, 1973) y como reservorio natural lo constituyen los armadillos, los marsupiales (*Didelphis sp.*), roedores, murciélagos, primates, además de animales domésticos como perros, gatos, incluso ratas y cobayos (Barreto, 1979).

La enfermedad de Chagas-Mazza (debe su nombre a los médicos Carlos Chagas y Salvador Mazza), Mal de Chagas o tripanosomiasis americana, es una enfermedad parasitaria neotropical, generalmente crónica causada por un protozoario flagelado, el *Trypanosoma cruzi*. El *T. cruzi* es miembro del mismo género que el agente infeccioso causante de la enfermedad del sueño en África, y de la misma familia que el agente que causa

la leishmaniasis, pero sus manifestaciones clínicas, distribución geográfica, el ciclo de vida y vector son muy diferentes.

Se considera que la enfermedad de Chagas es un padecimiento endémico en América, distribuyéndose desde México hasta Argentina, aunque existen vectores y reservorios incluso en el sur de los Estados Unidos, y con casos identificados, aunque esporádicos en Canadá y EE.UU (Fig. 5) (Scholfield y Días, 1995).

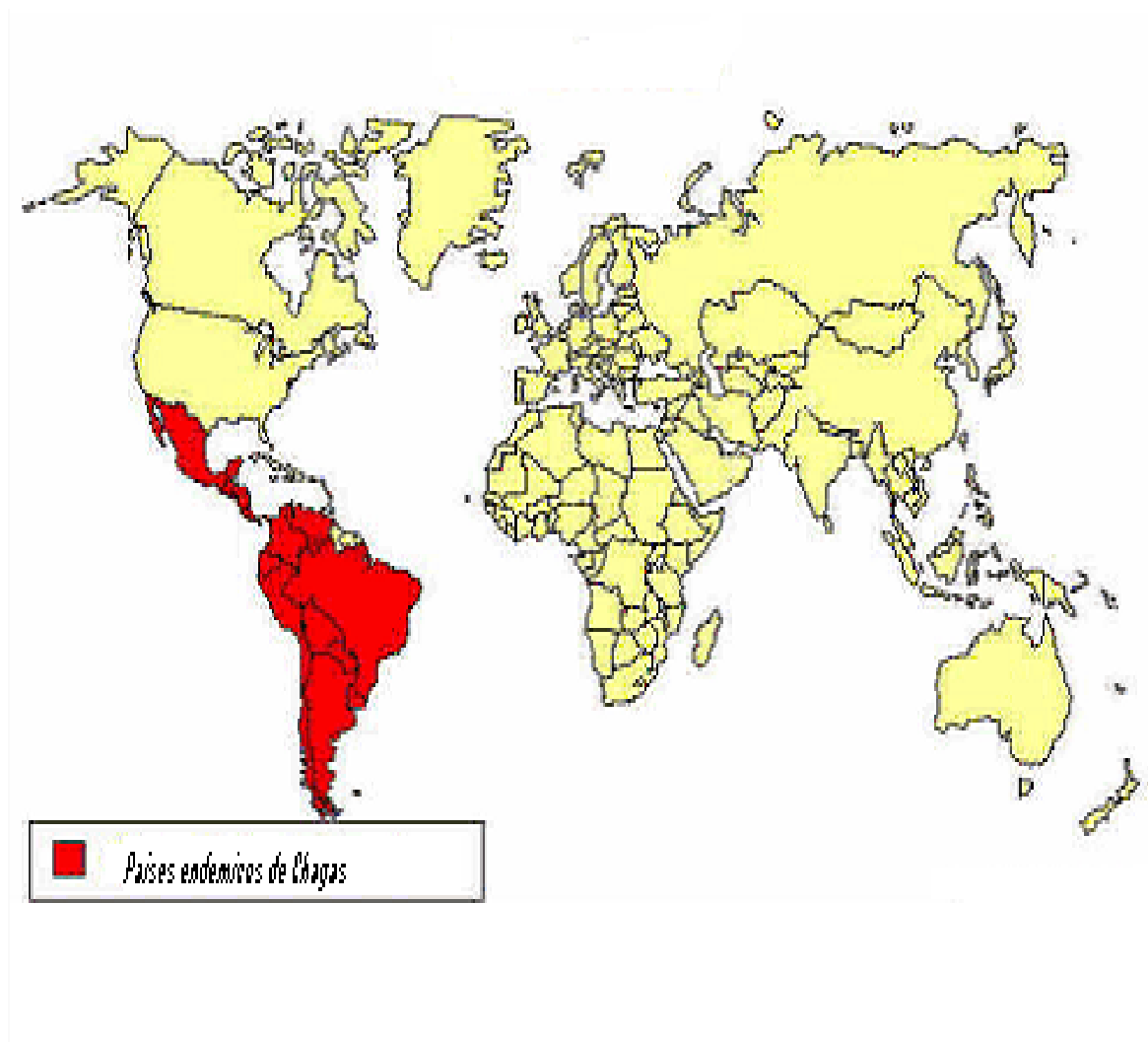


Figura 5. Distribución geográfica de la Tripanosomiasis americana en América. <http://medicina.ufm.edu/cms/es/Enfermedad-de-Chagas> [Consulta: 04 de marzo del 2010].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (<http://www.who.int/infectious.Disease-report.>, 2000) estima que la enfermedad de Chagas afecta entre 16 y 18 millones de personas, con unos 100 millones (25% de la población de Latinoamérica) de personas que estarían en riesgo de contraer la enfermedad, afectando anualmente cerca de 50 mil personas. La enfermedad crónica de Chagas sigue siendo un gran problema de salud en muchos países de América Latina, a pesar de la eficacia de medidas preventivas e higiénicas, tales como el eliminar los insectos transmisores, lo cual ha reducido a cero la aparición de nuevas infecciones en al menos dos países en la región (Uruguay y Chile). Con el incremento en la migración de poblaciones, la posibilidad de transmisión por transfusión sanguínea ha llegado a ser sustancial en los Estados Unidos y Europa. La parasitosis está establecida casi exclusivamente en áreas rurales, donde el insecto transmisor, correspondiente a la subfamilia Hemiptera, Familia Reduviidae, en Venezuela Triatominae (Chipo), se alimentan en su reservorio natural (los más comunes son el armadillo y marsupiales).

La diseminación del *T. cruzi* se da al entrar los parásitos por la herida causada por la picadura de chipos al entrar en contacto con las heces y a través del torrente sanguíneo (forma tripomastigote metacíclicos) alcanzando los diferentes órganos y tejidos, replicándose principalmente en tejidos musculares y nerviosos (forma amastigote). También pueden producirse infecciones agudas por contaminación de alimentos con heces de

insectos infectados. Es frecuente la aparición de cardiopatías chagásica, y daños irreparables en los plexos mesentéricos del tracto gastrointestinal, haciendo que la persona presente megaesófago, megacolon y que eventualmente muera; además de todo esto la persona puede no presentar síntomas, lo que beneficia al parásito ya que a través del tiempo se hace más patógeno. Aunque los Triatominae se alimentan de aves, éstas parecen tener mecanismos de inmunidad frente a la infección y por ello no son consideradas reservorios del *T. cruzi*, aunque puede haber un eslabón entre las aves como fuente alimentaria del insecto y la proximidad a las habitaciones humanas (Scholfield y Días, 1995).

1.2.1 Paninfectividad de *T. cruzi*

La infección de órganos aislados y del sistema reproductivo por *T. cruzi* ha sido descrito en la enfermedad de Chagas desde sus primeros estudios. Gran número de tejidos y órganos son parasitados con diferentes intensidades, incluyendo distintos tipos de células epiteliales, vasos sanguíneos, músculo cardíaco, músculo estriado, sistema respiratorio, tracto gastrointestinal, mesenterios, sistema nervioso, glándulas endocrinas, glándulas exocrinas, órganos linfohematopoiético, sistema reproductivo masculino y femenino, riñón, tracto urinario, tejido adiposo, ojo, hígado y piel. Un detallado análisis histopatológico de ratones infectados con *T. cruzi* en la fase aguda de la infección, mostró diferentes órganos afectados de acuerdo al sexo, mayoritariamente las estructuras genitales. En los ratones machos

se encontró en la glándula prepucial, piel, pene, albugínea testicular, epididimo, vasos deferentes, vesículas seminales, próstata, glándulas uretral y bulbo uretral y en los ratones hembra se encontraron en la vagina, uretra, oviducto, ovario, mesovario, clítoris y glándulas mamarias. En ambos sistemas reproductivos, los parásitos forman focos aislados, algunos causan una infiltración local de macrófagos y detritos, lo cual puede ser debido a la presencia de células apoptóticas. Estos resultados sugieren que los machos presentan una mayor susceptibilidad a la infección por el parásito. En algunos casos se han encontrado parásitos en las glándulas de Cowper y glándulas prepucial, reforzando la hipótesis de transmisión sexual y aumentando la posibilidad de transmisiones congénitas y de transparturación. Además la cepa CL de *T. cruzi* es altamente invasiva, sugiriendo que la panefectividad puede influir en el desencadenamiento de eventos inmunológicos y patológicos (Lenzi y col., 1996 y Lenzi y col., 1998).

1.2.2 Taxonomía.

El Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, pertenece al Reino **Protista**, Subreino **Protozoa**; Sub-phylum **Mastigophora**; orden **Kinetoplastida**, familia **Tripanosomatidae**, Género **Trypanosoma**, Sub-género **Schizotrypanum**, Especie **cruzi** (Hoare, 1972).

1.2.3 Ciclo de Vida

El ciclo de vida que desarrolla el parásito en el vector (conocido en Venezuela como chipo), toma de 5 a 6 días de evolución de acuerdo a varios parámetros determinados por el insecto como a la cepa o aislado del parásito, el estadio de desarrollo, condiciones fisiológicas y ambientales. El chipo ingiere las formas tripomastigotes pleomórficos y amastigotes (10% de la población del parásito), circulantes en la sangre de mamíferos infectados. Los flagelados pasan al intestino medio del vector donde los tripomastigotes sufren diferenciación a amastigotes y estos se diferencian a su vez hacia epimastigotes proliferativos, (Fig. 6) coexistiendo en la luz intestinal del Triatomino las formas amastigotes, epimastigotes (cortos y largos) y estadios intermedios entre ambos, ya que este proceso es continuo (Hoare, 1972).

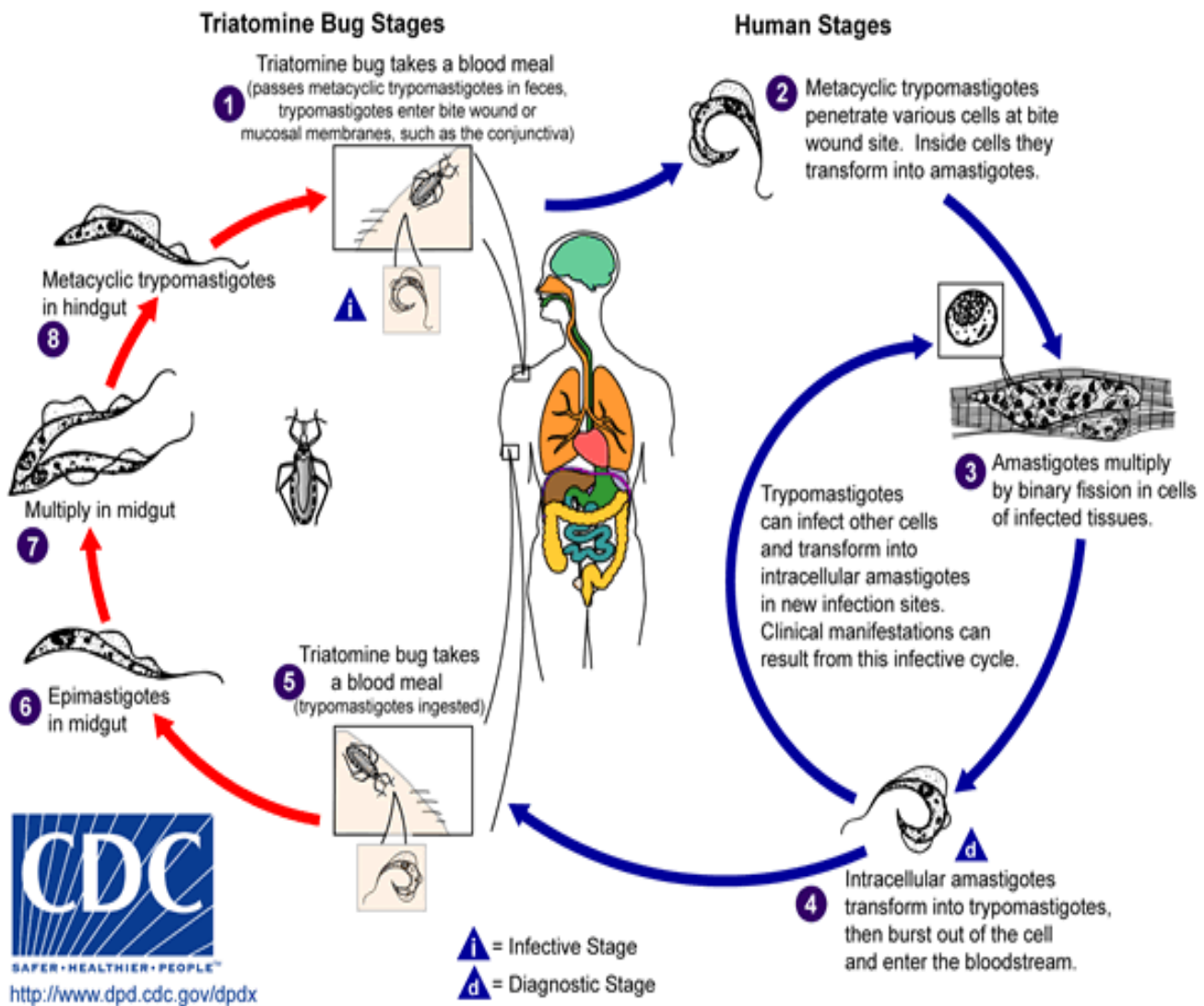


Figura 6. Ciclo de vida del *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*.

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>. [Consulta: 04 de marzo del 2010].

Los epimastigotes largos, colonizan la zona posterior del intestino (recto) y los túbulos de Malpighi (parte del sistema excretor del chipo) se unen a través de su flagelo, mediante enlaces hidrofóbicos, a la cutícula de las células intestinales, proceso que dispara la metaciclogénesis (mediada por AMPc). Una vez formados, los metacíclicos se separan de las células intestinales o del sistema excretor, para ser expulsados con las heces u orina contaminadas; en esta última se encuentra un mayor número de estadios infectantes (Hoare, 1972).

Los tripomastigotes (formas metacíclicos) penetran a través de la piel lesionada por la picadura del triatomino infectado, mediante la deyección de orina o heces contaminadas antes o después de la ingesta, o bien al hacer contacto directo con las mucosas oral, nasal y ocular; proceso conocido como infección por contaminación fecal. En el mamífero, los metacíclicos localizan e invaden numerosos tipos de células; la invasión ocurre a través de un mecanismo del parásito, en el cual los microtúbulos del citoesqueleto de la célula blanco son dirigidos al reclutamiento de lisosomas, los cuales se fusionan con la membrana plasmática formando la vacuola parasitófora, la cual permite la entrada del parásito. Los tripomastigotes liberados en el citoplasma celular, se diferencian en amastigotes proliferativos, éstos en epimastigotes intermedios y posteriormente en tripomastigotes, constituyendo nidos o pseudoquistes, para luego ser liberados de las células, como estadios delgados con una alta capacidad de reinvadir células para

mantener el parasitismo celular; también pueden diferenciarse y adquirir formas más anchas, haciéndolos competentes para infectar al vector, pudiendo coexistir en sangre como tripomastigotes delgados, anchos y rechonchos, que son definidos así como los estadios pleomórficos del parásito (Tyler y Engman, 2001). Las células que se lisan prematuramente, pueden liberar directamente amastigotes al torrente sanguíneo o linfático, los cuales pueden ser fagocitados por macrófagos y mantener de igual forma el parasitismo celular. Los estadios amastigotes y tripomastigotes pueden infectar al vector durante su ingesta sanguínea, completándose así el ciclo de vida del *T. cruzi* (Tyler y Engman, 2001).

2. Antecedentes

Las medidas profilácticas de estas enfermedades están orientadas a combatir a los vectores, reservorios y proteger a la población susceptible, sin embargo el control de reservorios selváticos en zonas tropicales es difícil. La lucha contra los insectos no son muy efectivas ya que los vectores han desarrollado una resistencia natural contra los insecticidas y estos solo disminuyen la transmisión doméstica y peridoméstica (Belfort y Botto, 2000).

En Venezuela, existen programas para el control de las enfermedades por tripanosomatideos, ya que hoy en día estas no se restringen a zonas rurales, sino que ya se encuentran en las zonas urbanas, pueblos y ciudades constituyen un problema de salud pública; aunado a ello, los tratamientos para la leishmaniasis y la tripanosomiasis americana son costosos y

complicados y presentan una morbilidad sustancial por lo que a menudo se requiere la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

En el tratamiento de la LTA se han usado numerosos medicamentos y medidas terapéuticas de diversa índole. Inicialmente Vianna introdujo las sales de antimonio y posteriormente Nicolle demostró que tenían un efecto beneficioso en la Tripanosomiasis Americana (Bonfante y Barroeta, 2002). La terapia con antimoniales fue tradicionalmente utilizada de manera empírica en el tratamiento de la leishmaniasis, pero estas quimioterapias son ineficientes en muchos casos, además de presentar severos efectos secundarios. Los antimoniales pentavalentes más utilizados son el Pentostam® (Estibogluconato de Sodio) y Glucantime® (Antimoniato de Meglumina), las cuales son suministradas tanto para la leishmaniasis cutánea como visceral, Es sabido que para ser activos contra el amastigote deben ser capaces de penetrar la célula hospedadora (macrófago), atravesando para ello la membrana fagolisosomal, y deben ser reducidos a la forma de antimonial trivalente, los detalles acerca de los mecanismo de oxidación y el lugar exacto de esta conversión no son precisos (Oullette y col., 2004), pero se han reportado casos de resistencia clínica a estas drogas desde muchas partes del mundo, por esta razón la resistencia a antimoniales pentavalentes es una de las principales prioridades de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (<http://www.who.int/infectious.Disease-report>, 2000). La resistencia a drogas es el mayor impedimento en el tratamiento de

la leishmaniasis; ello ha conducido a la utilización de tratamientos alternativos, tales como Anfotericina B, Pentamidina, Paramicina y más reciente Miltefosina, el cual es un inhibidor de la biosíntesis de esteroides (Ver la Figura 7), sin embargo ya se ha encontrado que *Leishmania* ha presentado resistencia a esta droga ([http://www.who.int/infectious. Disease-report](http://www.who.int/infectious.Disease-report), 2000; Ponte-Sucre, 2003; Faraut-Gambarelli y col., 1997).

Droga	Tasa de cura (promedio)	Terapia recomendada	Mecanismo de acción	Utilizada en el tratamiento de Leishmaniasis . . .
Glucantime® Pentostan®	60%	20mg/Kg/d x30		Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral
Pentamidina	90%	2.140 mg	Inhibe la síntesis proteica, Fosfolípidos y fosforilación oxidativa	Leishmaniasis visceral
Alopurinol	No determinado	20mg/Kg x Periodos Indefinidos	Interrumpe el metabolismo De los ácidos nucleicos, Eliminando las purinas disponibles para incorporar en la síntesis de ácidos nucleicos.	Leishmaniasis visceral/canina
Aminocidina	No determinado		Aminoglicósido, bloquea la síntesis proteica	Leishmaniasis cutánea y mucocutánea
Anfotericina B	88%	2.500 mg	Afecta la síntesis de ergosterol	Leishmaniasis cutánea y mucocutánea
Anfotericina B liposomal	≈100%	2.500 mg		
Miltefosina	90-95%	5 mg/Kg/día X 4 semanas	Interfiere en el metabolismo de los ALP, alfil-glicolípidos de anclaje y glicoproteínas	Leishmaniasis visceral
Ketoconazol	≈39%	100 mg	Inhibe la síntesis de ergosterol	Leishmaniasis cutánea
Anfidicolina	No determinado		Inhibe la división celular y la ADN polimerasa de <i>Leishmania</i> spp.	Leishmaniasis cutánea y mucocutánea

Figura 7. Drogas empleadas en el tratamiento de la Leishmaniasis

Por otra el número de control quimioterapéutico contra la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, se enfoca en eliminar el parásito (tratamiento etiológico) y corregir el daño producido por el parásito. El tratamiento antiparasitario para esta enfermedad debe ser considerado en función de la fase de la enfermedad, en la fase aguda de la enfermedad el tratamiento empleado son las siguientes drogas: Nifurtimox, un nitrofurano, a la dosis de 8-10 mg/kg/día, vía oral, por 1 a 2 meses y Benznidazol, un derivado imidazólico, a la dosis de 5-6 mg/kg/día, vía oral, por 1 a 2 meses, tomando en cuenta que la aplicación de estos medicamentos y sus dosis dependen de la edad y de las condiciones clínicas del paciente. Estas drogas destruyen efectivamente los tripomastigotes sanguíneos y previenen la colonización de nuevos tejidos, de ahí su eficacia en esta fase. En la fase crónica, el uso de Nifurtimox o el Benznidazol no ha demostrado que modifique el curso natural de esta enfermedad, en esta fase los tratamientos etiológicos son limitados. Deben tratarse en estos casos los trastornos del ritmo cardíaco con drogas anti-arritmicas como la Amiodarona o con el Mexiletine, con lo cual se obtiene más éxito. Aunque se ha encontrado que estas drogas en ambas fases de la enfermedad, presentan contraindicaciones de hipersensibilidad y otros efectos adversos como por ejemplo polineuritis y neutropenia. (Carlier, 2003).

Actualmente se encuentran en estudio nuevas alternativas quimioterapéuticas para estas enfermedades, las cuales están aquellas

fundamentadas en atacar al parásito en sitios vitales del metabolismo. Así mismo es importante resaltar que el desarrollo racional de medicamentos (realmente efectivos y exitosos), conlleva necesariamente a disponer de un amplio conocimiento en cuanto a la Bioquímica y Biología Celular de los parásitos de modo tal que puedan ser detectadas aquellas funciones celulares u organelos diferenciales con el huésped como potenciales blancos para el diseño y /o el descubrimiento de nuevas drogas.

Son por estas razones que numerosas investigaciones a nivel mundial están dedicadas a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para estas enfermedades, partiendo del estudio profundo de diferentes aspectos del metabolismo, ciclo celular, componentes estructurales y aspectos bioquímicos de los parásitos.

La selección de una droga en particular, para ensayos experimentales *in vitro* e *in vivo* sobre el parásito está basado generalmente en su estructura molecular, su conocido efecto contra otros parásitos o enfermedades, o puede ser específicamente diseñado o seleccionado hacia un punto susceptible del parásito, lo cual permitirá el desarrollo de vías alternativas para el tratamiento, y estas podrían ser combinadas con las ya existentes para un potencial efecto contra los parásitos.

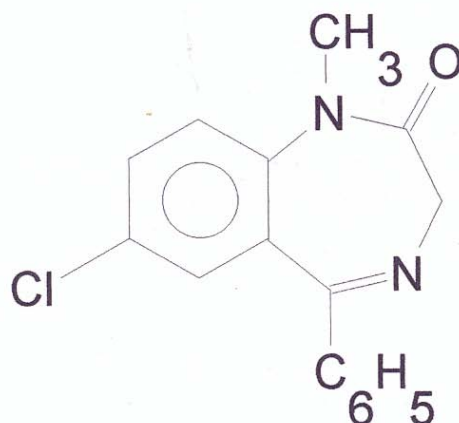
En nuestro laboratorio uno de los enfoques que se ha estado desarrollando, en la búsqueda de drogas alternativas para el tratamiento de la

leishmaniasis y tripanosomiasis, es probar compuestos usados comúnmente en humanos para el tratamiento de ciertas afecciones, particularmente aquellas del Sistema Nervioso Central, de los cuales se haya reportado una acción sobre una actividad particular importante en diferentes tipos celulares, como alteraciones de algunos componentes del citoesqueleto o bloqueos a nivel de la división celular. El compuesto que hemos seleccionado para estudiar su acción sobre *T. cruzi* y *L. mexicana* es el Diazepam (Valium /Roche®) y/o (Talema/BIOTECH).

2.1 Diazepam

El Diazepam es una benzodiazepina que puede ser administrada por vía oral, intramuscular, o intravenosa para la ansiólisis (incluyendo desórdenes de ansiedad y de pánico), actividad anticonvulsivante, sedación preoperatoria, desintoxicación alcohólica/*delirium tremens*, y relajación del músculo esquelético.

El nombre químico es 7- cloro-1,3- dihidro-1- metil-5- fenil- 2H- 1,4- benzodiazepina-2- ona (Fig.8). Tiene un peso molecular de 284.74 KDa.



DIAZEPAM

(7-Chloro- 1,3 -dihydro- 1 -methyl- 5 - phenyl- 2H - 1,4 -benzodiazepin- 2 - one)

Figura 8. Estructura molecular del diazepam (7- cloro-1,3- dihidro-1- metil-5- fenil- 2H- 1,4- benzodiazepina-2- ona) [Tomado de: Hernández, 1996].

Las benzodiazepinas son compuestos heterocíclicos conformados por un anillo de benceno fusionado a un anillo de diazepina. Su sitio de acción es el receptor GABA-A en el cerebro de los mamíferos. La acción inhibitoria de GABA resulta de la activación de un canal de cloruro que está directamente acoplado al receptor GABA-A. Estos agentes producen sus consecuencias clínicas incrementando el efecto de GABA sobre el canal de cloruro que esta acoplado directamente al receptor (Levitan y Laezmarek, 2002). Cualquier grado de hidrogenación, cualquier sustituyente y cualquier isómero H, potencian el efecto inhibitorio del Ácido Gamma Aminobutírico (GABA) sobre

las neuronas del SNC por unión a los receptores de las benzodiazepinas. Estos receptores se localizan cerca de los receptores GABA en los canales del cloruro dentro de la membrana celular neuronal (Fig.9). La combinación GABA ligando/receptor mantiene el canal de cloruro abierto produciendo hiperpolarización de la membrana quedando la neurona resistente a la excitación (Levitan, y Laezmarek, 2002).

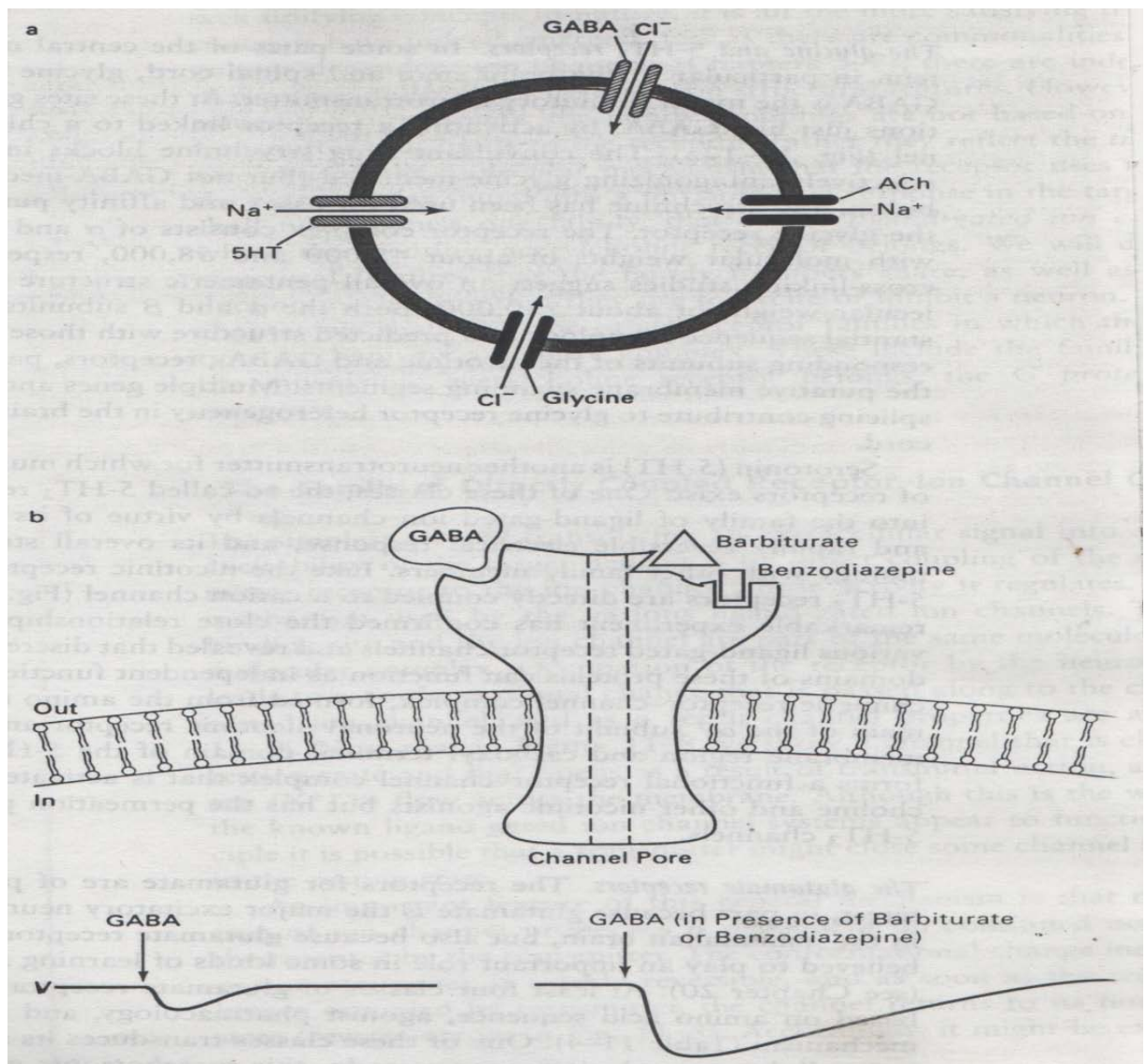


Figura 9. El receptor GABA-A. **a.** El receptor GABA-A esta íntimamente acoplado a canales selectivos del ion cloro, en contraste a otros receptores. **b.** El complejo canal- receptor GABA-A, posee sitios de unión para barbituratos y benzodiazepinas, que pueden incrementar marcadamente la respuesta hiperpolarizante a GABA (Levitan y Laezmarek, L. 2002).

Los receptores GABA (Receptores de Ácido Gamma Aminobutírico) son proteínas de la superficie celular que se unen con alta afinidad al GABA y que desencadenan cambios que influyen en el comportamiento de las células. Los receptores GABAA controlan los canales de cloro formados por el propio complejo del receptor.

Se ha reportado que el Diazepam ejerce un efecto drástico sobre la división celular de algas unicelulares impidiendo la división y separación del cuerpo basal a concentraciones de 26 µg/ml (Marano y col., 1984) causando un efecto inhibitorio sobre la proliferación de los cultivos sincronizados de *Dunaliella sp.*, cuando la droga es añadida durante el ciclo celular. La droga induce una acumulación de formas mitóticas anormales después de 17 a 24 horas de tratamiento, con una distribución de los cromosomas alrededor del núcleo y un huso monopolar, sin afectar los microtúbulos de los polos a los cromosomas. En cultivos de varias líneas celulares hematopoyéticas humanas tratadas con diazepam, se ha encontrado acumulación de formas mitóticas condensadas, mientras que en cultivos de fibroblastos humanos el Diazepam parece bloquear la mitosis inhibiendo la separación centriolar en prometafase, no afectando la integridad de los microtúbulos a concentraciones hasta de 80 µg/ml (Anderson y col., 1961). Por otra parte, el Diazepam inhibe reversiblemente el desplazamiento de fibroblastos de embrión de pollo en forma dosis dependiente. La inhibición está acompañada de una disminución y menor organización de los microfilamentos y una

reducción del contenido de miosina con respecto al control. (Nagele y col., 1983). Relacionado con estos hallazgos se encontró que el Diazepam causa el cese inmediato de las contracciones espontaneas de fibras musculares esqueléticas embrionarias de pollo *in vitro*; luego de 24 a 48 horas de incubación con 100 μ M Diazepam ,las fibras relajadas no acumulan miosina y hay un bloqueo de la fusión de células mioblásticas. Esto se correlaciona con la inhibición progresiva de la síntesis de miosina .En células musculares esqueléticas totalmente diferenciadas *in vitro*, el Diazepam causa una relajación completa e inmediata de las fibras musculares, reduciendo marcadamente la acumulación de cadenas pesadas de miosina a las 48 horas de incubación, acompañado de inicios de atrofia de la fibra muscular (Walker y col., 1979). Por otra parte, la incubación de células Friend con ocho benzodiazepinas por cinco días, dio como resultado que tres de ellas indujeron diferenciación, siendo el diazepam el más activo a una concentración de 35 μ g/ml, así como también al bloquear la mitogénesis en células 3T3 a concentraciones de 64 μ g/ml, siendo su efecto citostático mas que citotóxico a esa concentración. Se plantea que estos hallazgos pueden tener aplicación en la quimioterapia del cáncer ya que agentes benignamente lipofílicos como el Diazepam pueden aumentar el índice terapéutico de drogas anticancerígenas, entre ellas los alcaloides Vinca. (Clarke y Ryan, 1980). En estudios previos realizados en el Laboratorio de Biología Celular de Parásitos se encontró que esta droga inhibe la proliferación de

promastigotes de *L. mexicana* en forma dosis dependiente, con un CI_{50} (concentración inhibitoria en el crecimiento del 50% de la población) de 20 $\mu\text{g/ml}$. Por microscopia electrónica se observaron alteraciones a nivel de la base flagelo y la mitocondria (Hernández, 1996). Estos resultados y los interesantes reportes previos en otros tipos celulares mencionados anteriormente nos llevó a investigar más profundamente sobre la acción de esta droga sobre la biología celular de *L. mexicana* y *T. cruzi* a través de este proyecto.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General.

Determinar la acción del Diazepam sobre la biología celular de los promastigotes de *Leishmania mexicana* (cepa NR) y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Cepa BIOMED) como nueva alternativa terapéutica para los tratamientos de estas parasitosis.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la acción antiproliferativa del Diazepam sobre los promastigotes de *Leishmania mexicana* (cepa NR) y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Cepa BIOMED).
2. Determinar los efectos del Diazepam sobre la morfología y ultraestructura de los promastigotes de *Leishmania mexicana* (cepa NR) y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Cepa BIOMED)
3. Determinar el efecto citotóxico del Diazepam sobre los macrófagos de la línea J774 y células VERO.
4. Evaluar la actividad del Diazepam sobre los amastigotes de *Leishmania mexicana* en macrófagos de la línea J774
5. Evaluar el efecto del Diazepam sobre el proceso de diferenciación en *Leishmania mexicana*.

4. Materiales y Métodos

2.1 Sistemas Biológicos

4.1 Parásitos:

Se utilizó *L. mexicana* cepa NR (Ramírez y Guevara, 1987). la cual se cultivó y mantuvo en el Laboratorio de Biología Celular de Parásitos del Instituto de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, con pasajes sucesivos cada cinco días, en medio Schneider suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado y 100 µl de gentamicina (1mg/ml) a 26°C.

Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Biomed, donado por la Dra. Leidy Herrera, Jefa del Laboratorio de Tripanosomas de Mamíferos del Instituto de Zoología y Ecología Tropical de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, obtenida de un caso de infección humana de Chichiriviche en el 2009, Linaje 1. Cultivos de *T. cruzi* cepa Y, donada por la Dra. Yelitza Campos del Laboratorio de Fisiopatología del Instituto de Biomedicina de la Universidad Central de Venezuela. Fueron cultivadas y mantenidas en el laboratorio de Biología Celular de Parásitos del Instituto de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, en agitación, en medio LIT para tripanosoma suplementado con 10% de SFB inactivado y 100 µl de Gentamicina (1mg/ml), a 26 °C.

4.2 Cultivos de líneas celulares.

Se utilizaron células Vero y macrófagos de la línea J774.

4.2.1 Células Vero. Donadas por el Dr. Francisco Arvelo, del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. Fueron mantenidas en medio DMEM (Gibco), suplementado con 1% de Penicilina/ Streptomycin, 1% de Glutamina y 10 % SFB activado, en frascos de plástico, de la casa Falcon, de 25 ml. Las células fueron incubadas en cámara de temperatura controlada a 37 °C, en ambiente de CO₂ al 5%. Repicadas cada 4 días.

4.2.2 La línea de Macrófagos J774. fue donada por el Dr. Francisco Arvelo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores de la Facultad de Ciencias del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela, y **la línea de Macrófagos J774. G8** y por la Dra. Noris Rodríguez del laboratorio de Ingeniería Genética del Instituto de Biomedicina del Hospital Vargas, ambas fueron cultivadas y mantenidas en medio RPMI (Gibco 1640), suplementado con 1% de Penicilina/ Streptomycin, 1% de Glutamina y 10 % SFB activado, en frascos de plástico, de la casa Falcon de 25 ml, incubados en cámara de crecimiento con atmósfera de CO₂ al 5%, a una temperatura de 37 °C. Se realizaron repiques cada 4 días.

4.3 Metodologías

4.3.1 Efecto del Diazepam sobre la proliferación de los promastigotes de *L. mexicana* y epimastigotes de *T. cruzi*.

En ertulas de 250 ml se colocaron cultivos de 2×10^6 cel. /ml de promastigotes de *L. mexicana* en 10 ml de medio Schneider, a los cuales se les añadió diferentes concentraciones de Diazepam en un rango entre 20 µg/ml y 100 µg/ml. Una de las ertulas conteniendo la misma cantidad de parásitos sin droga añadida se tomó como control. Se estimó su crecimiento mediante medidas espectrofotométricas a 560 nm durante cinco días. De igual manera se realizaron los ensayos con epimastigotes de *T. cruzi*, partiendo de cultivos de 3×10^6 cel. /ml en 10 ml de medio LIT para tripanosoma. En ambos casos se realizaron observaciones de los cambios morfológicos producidos por efecto de la droga, por microscopia de luz y se realizaron pruebas de viabilidad usando las estimaciones cualitativas del ensayo con MTT.

4.3.2 Procesamientos de los promastigotes y epimastigotes para microscopía electrónica de transmisión.

Los parásitos en condiciones normales y tratados con Diazepam en concentración superior al CI_{50} de 45 µg/ml, se colectaron y centrifugaron a 4500 g por 10 min, a 4 °C. Se lavaron tres veces en buffer PBS 1X pH 7.0 y el “pellet” se fijó en glutaraldehído al 2,5 % con 0,8 % de ferrocianuro de

potasio por 1 hora. Luego de lavar tres veces en buffer PBS 1X pH 7.0 se fijó en tetróxido de Osmio al 1 % en buffer PBS durante 1 hora. Se lavó de nuevo tres veces en buffer PBS pH 7.0 y se procedió a la deshidratación, por una batería de alcoholes en concentraciones crecientes 70, 90, 95 %, durante 15 minutos cada uno, alcohol al 100 % 30 min y dos cambios de 15 min y 45 min con Óxido de Propileno. Seguidamente se colocaron las muestras en una mezcla Oxido de Propileno: Epón 1:1 por 24 horas, seguidas de impregnación por la resina pura durante 6 horas y finalmente incluidas en Epón en cápsulas de polietileno. Se colocaron en una estufa a 60 °C durante 48 horas para la polimerización de la resina y posteriormente se hicieron cortes en un ultramicrotomo Porter Blum con cuchilla de diamante y se tiñieron con acetato de Uranilo y Pb, para su observación en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi 7000.

4.3.3 Ensayos de citotoxicidad del Diazepam sobre promastigotes de *L. mexicana*, epimastigotes de *T. cruzi*, macrófagos J774 y células Vero. Determinación del CI_{50} .

La citotoxicidad “*in vitro*” del Diazepam sobre los diferentes tipos celulares, se determinó mediante el ensayo con MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol 1-2-y1)-2,5-difeniltetrazol) el cual se basa en la reducción metabólica de la molécula, debida a la acción de la enzima succinato-deshidrogenasa mitocondrial (Fig. 10), formándose un compuesto coloreado azul-violeta llamado Formazán el cual es soluble en el detergente SDS. La presencia de

diversos tonos de coloración es proporcional al número de células metabólicamente activas (Fig. 11) (Mosman, 1983).

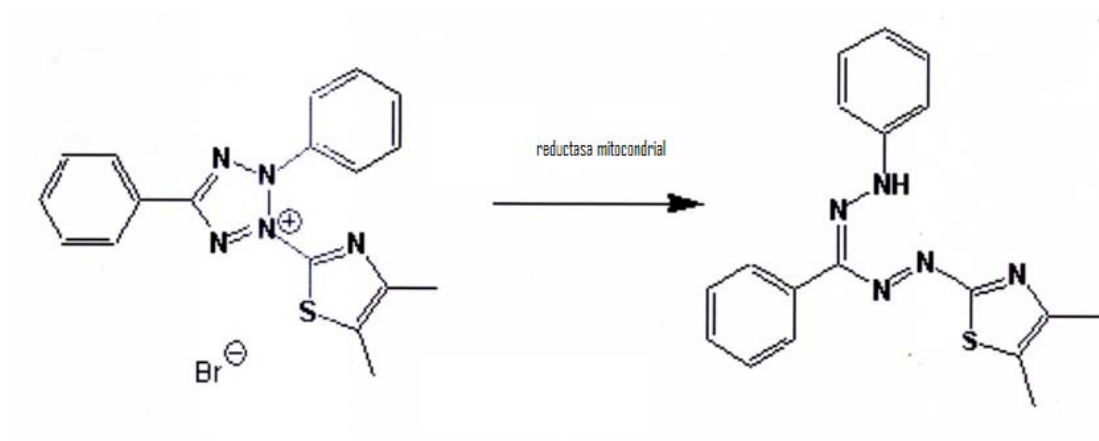


Figura 10. Representación esquemática el proceso metabólico del MTT

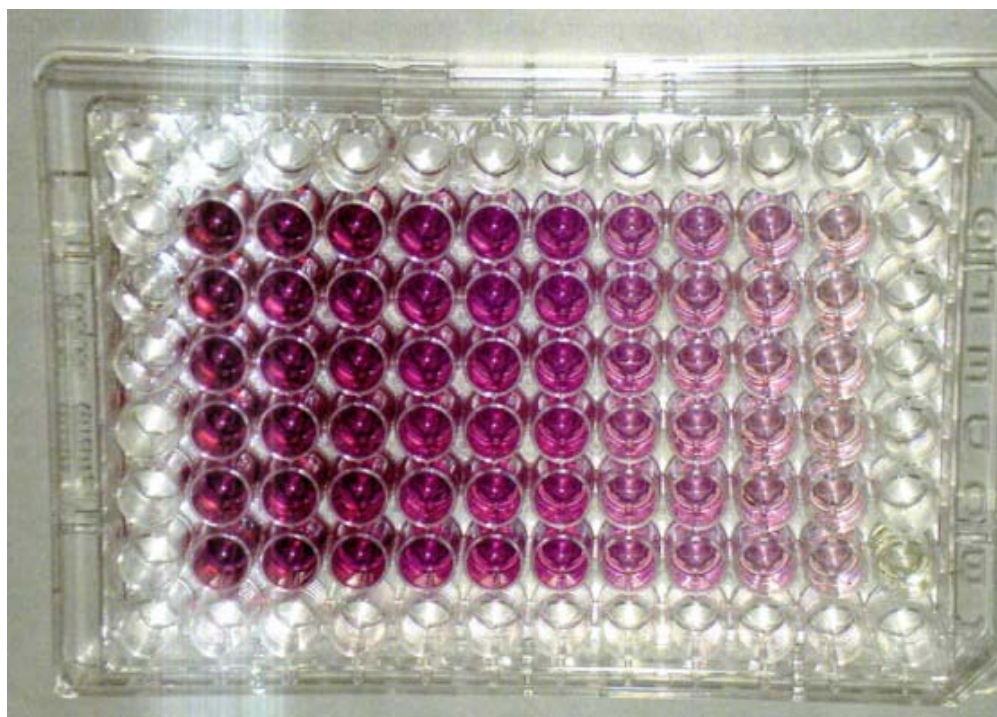


Figura 11. Visualización de un ensayo con el MTT

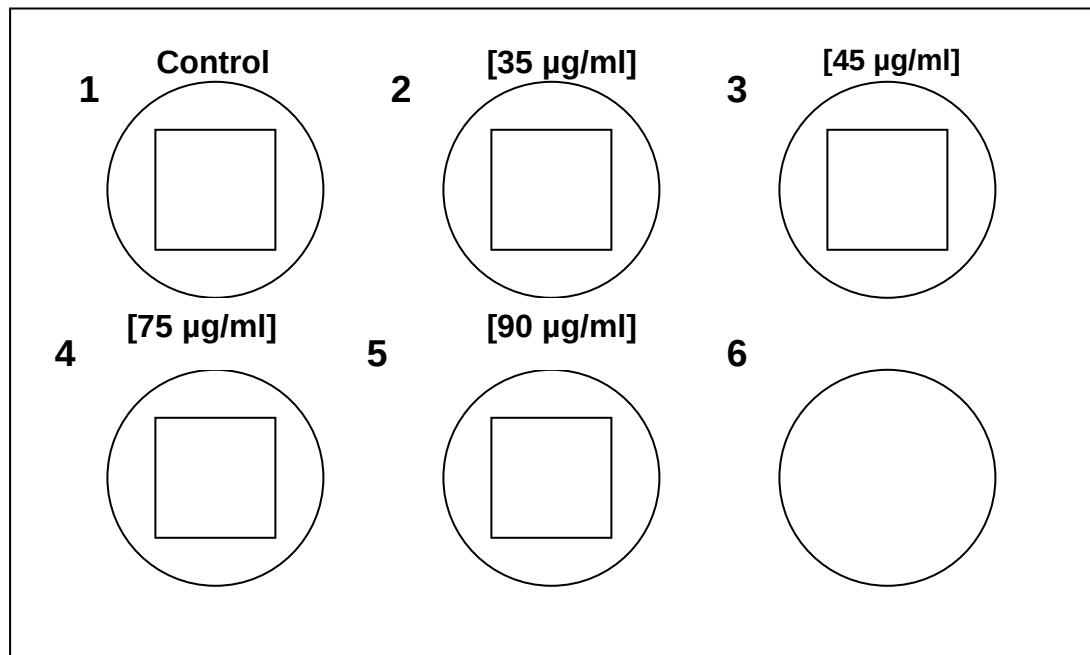
Para realizar este ensayo se agregó en una placa de ELISA de 96 pozos, 50 μ l de la suspensión celular (8000 cel. /pozo para el caso de los macrófagos y células Vero y 10000 cel. / pozo de promastigotes y epimastigotes). A las 24 horas las células se trataron con Diazepam a diferentes concentraciones en un rango entre 5 μ g/ml a 150 μ g/ml por duplicado e incubadas por 48 horas a la temperatura adecuada, dependiendo del tipo celular (37 °C para las células y 27 ° C para los parásitos). El medio de cada pozo fue removido y se agregaron 90 μ l de medio fresco mas 10 μ l de MTT (5 mg/ml en la solución stock) se dejó aproximadamente de 2 a 3 horas, hasta que se desarrolló el color en el control; luego se añadió 100 μ l de SDS al 10 % para su medición, en un lector de ELISA a 550 nm.

4.3.4 Efecto del Diazepam sobre amastigotes de *L. mexicana* en macrófagos J774.G8

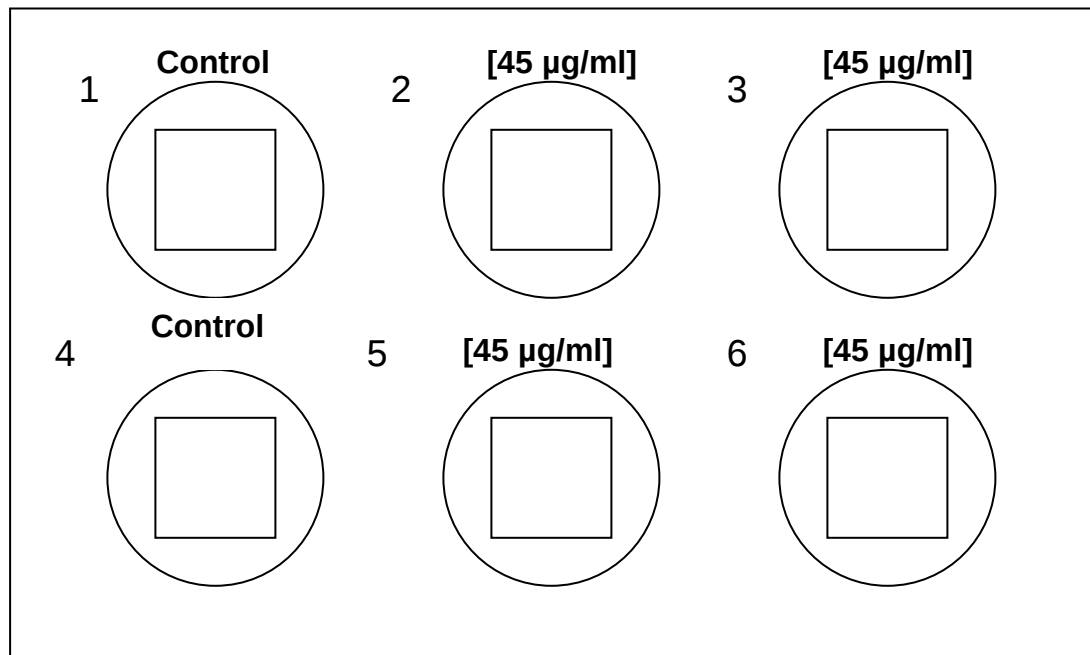
Los macrófagos se cultivaron en frascos plásticos de 250 ml, hasta confluencia , posteriormente se resuspendieron en medio RPMI y se procedió a sembrarlos sobre laminillas estériles colocadas en cámaras de 6 pozos , aproximadamente 500.000 macrófagos por laminilla a las cuales se les agregó 3 ml de medio RPMI suplementado con 20 % de SFB y 1% de Streptomicina /Penicilina en cada pozo .El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- ❖ Se lavaron las células 2 veces con PBS 1X estéril
- ❖ Se agregaron 2 ml de medio RPMI suplementado y se rastrilló con una paleta estéril para desprender los macrófagos.
- ❖ Se procedió a realizar el conteo de las células en una cámara de Newbauer
- ❖ Se sembraron, dispersándolos por toda la laminilla, 500 µl de la suspensión de macrófagos conteniendo aproximadamente 500.000 macrófagos , se esperaron 10 minutos para permitir la adhesión a las laminillas y se completó hasta un volumen final de 3 ml con medio RPMI suplementado , Se incubaron por 24 horas en cámara de crecimiento a 37 °C con 5% de CO₂ y 90 % de humedad.

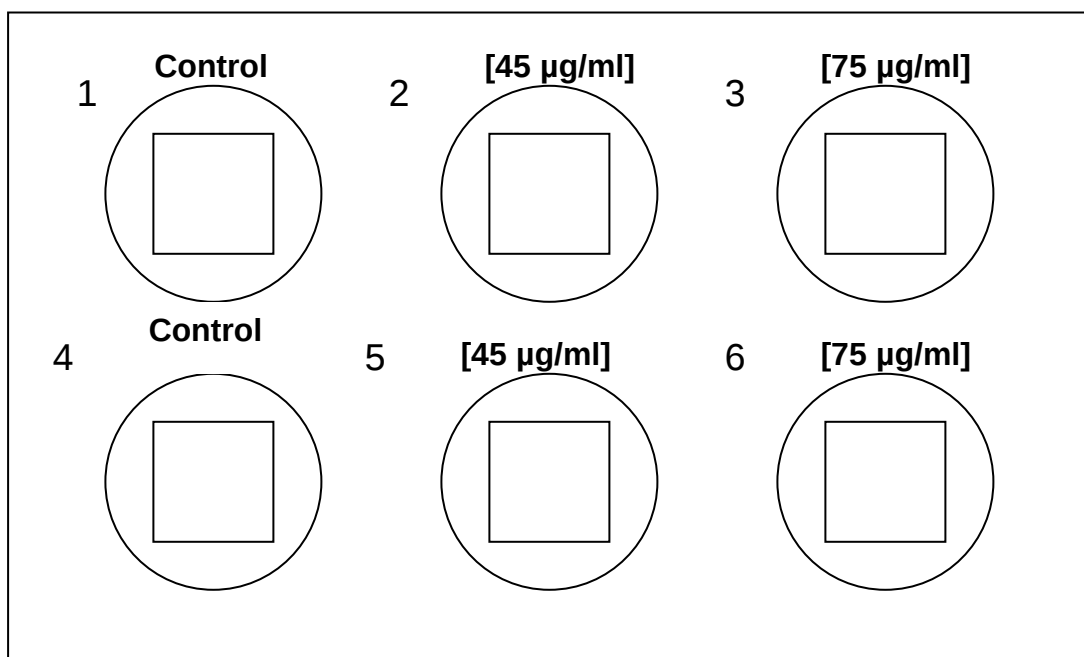
- ❖ A las 24 horas se cambió el medio y se añadió medio fresco conteniendo los parásitos en una relación 10:1 parásitos por macrófagos.
- ❖ Este procedimiento se usó para los tres tipos de ensayos que se realizaron .Ensayo **1.** Determinar el efecto de la droga en el proceso de infección del parásito sobre el macrófago, Ensayo **2.** Determinar la capacidad de infección de los parásitos previamente tratados con la droga y Ensayo **3.** Efecto de la droga sobre los amastigotes dentro del macrófago.
- ❖ **Ensayo 1:** Seguidamente al agregar los parásitos a los macrófagos se procedió a añadir el Diazepam a diferentes concentraciones , 35 µg/ml, 45 µg/ml, 75 µg/ml y 90 µg/ml, dispuestos de la siguiente manera:



- ❖ Se incubaron por 48 horas en la cámara de crecimiento a 37 °C 5% CO₂
- ❖ Se procedió a realizar la tinción de las laminillas con Giemsa
- ❖ **Ensayo 2:** Para este ensayo se incubaron previamente los promastigotes de *L. mexicana* con Diazepam a una concentración de 45 µg/ml , durante 48 horas , a temperatura ambiente y luego se procedió a añadirlos a los macrófagos en una proporción 10: 1 .



- ❖ Luego de 48 horas de incubación en cámara de crecimiento a 37 °C, 5% CO₂, se procedió a realizar la tinción de las laminillas con Giemsa.
- ❖ **Ensayo 3:** En este ensayo se añadieron los parásitos a los macrófagos en la relación de parásito/macrófago estipulada y se incubaron en la cámara de crecimiento. Transcurridas 24 horas se observó que los parásitos habían sido internalizados por los macrófagos y se procedió a aplicar el tratamiento con el Diazepam. Para ello se utilizaron dos diferentes concentraciones de la droga , 45 µg/ml y 75 µg/ml, dispuestas de la siguiente manera:



- ❖ Se incubaron por 48 horas en la cámara de crecimiento a 37 °C y 5 % CO₂, al cabo del cual se procedió a realizar la tinción con Giemsa.
- ❖ Cada uno de los experimentos anteriores se realizaron por triplicado.

Procedimiento para la tinción con Giemsa:

- ❖ Se coloca cada laminilla sobre un porta objeto y se fija el material con metanol por 4 minutos o hasta que este se evapore totalmente.
- ❖ Se añade Giemsa (2 gotas de Giemsa por cada ml de agua de chorro) y se deja por 30 minutos.
- ❖ Se lava con agua de chorro y se deja secar.
- ❖ Se coloca la laminilla invertida sobre una gota de Bálsamo de Canadá colocada en un portaobjetos. Se rotulo debidamente

Se procedió a realizar el conteo correspondiente en cada uno de los experimentos realizados de 100 macrófagos por lámina para establecer el porcentaje de infección. Para determinar el efecto de la droga sobre los amastigotes en los macrófagos se utilizó la siguiente fórmula: **% de infección** = (% de macrófagos infectados tratados con Dz/ % macrófagos infectados control) (Chan y Fong, 1990) conjuntamente se realizaron registros fotográficos mediante una cámara fotográfica.

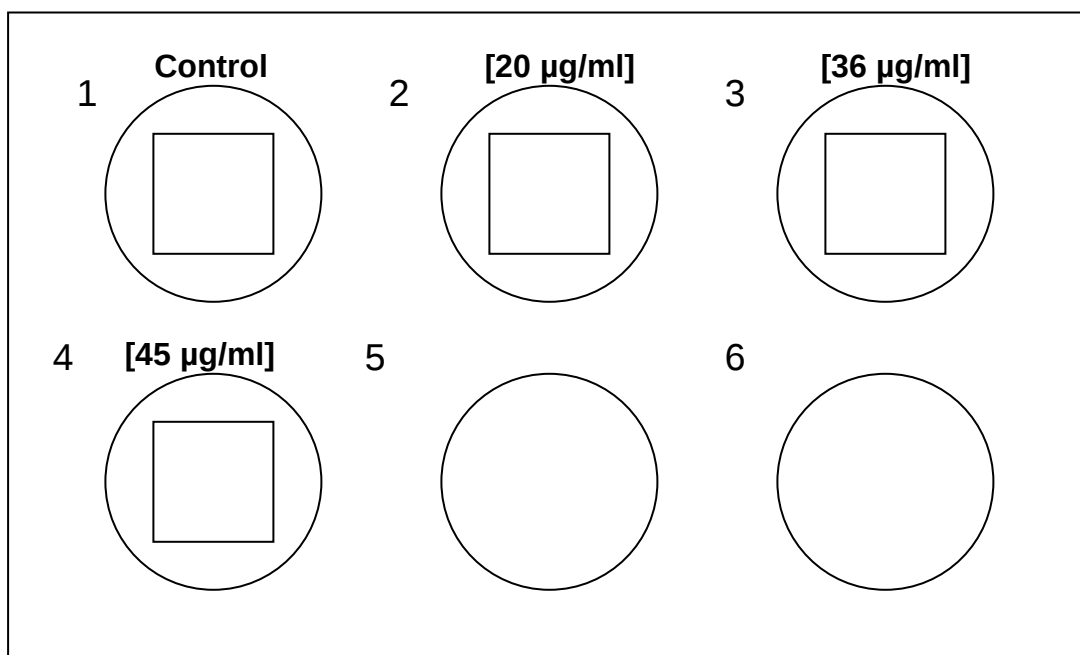
4.3.6 Estimación cualitativa del potencial eléctrico transmembrana mitocondrial en promastigotes de *L. mexicana* con rodamina 123.

La rodamina 123 es un catión fluorescente el cual es selectivamente acumulado en la mitocondria de células viables; este catión constituye un marcador específico de mitocondrias. Esta molécula indicadora, permite valorar cualitativamente la magnitud del potencial de membrana mitocondrial y revelar aspectos ultraestructurales del organelo (Johnson y col., 1980; Johnson y col., 1981; Skulachev, 1988). Este catión ingresa a la mitocondria cuyo interior está cargado negativamente y se distribuye entre las membranas según el potencial electroquímico de H^+ a través de la membrana interna mitocondrial. La acumulación en el interior de las mitocondrias es consecuencia del gradiente de protones existente en las mismas y de las características fisicoquímicas del compuesto

- ❖ Los parásitos en condiciones normales y tratados con Diazepam al Cl_{50} [33 $\mu\text{g/ml}$], se colectaron y centrifugaron a 4500 g por 10 min. a 4 °C y se lavaron tres veces en buffer PBS 1X pH 7.0.
- ❖ Posteriormente el sedimento se resuspendió en Rodamina 123 a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron por 10 minutos. Se lavaron tres veces en buffer PBS 1X pH 7.0, y se observaron los parásitos en un microscopio de fluorescencia bajo un objetivo de inmersión de 100X. Se realizaron registros fotográficos.

4.3.7 Efecto del Diazepam sobre el proceso de diferenciación celular en *L. mexicana*.

- ❖ Para determinar si el Diazepam interfiere con el proceso de diferenciación de promastigotes de *L. mexicana* a la forma amastigotes y viceversa, se cultivaron células en medio Schneider a 27°C, pH 7.4.
- ❖ Se sembraron en una cámara estéril de 6 pozos, 2×10^6 promastigotes de *L. mexicana* en medio Schneider por cada pozo y se aplicaron tres concentraciones de la droga en estudio, 20 $\mu\text{g/ml}$, 36 $\mu\text{g/ml}$ y 45 $\mu\text{g/ml}$. Se incubaron en una cámara de crecimiento a 34 °C y 5% CO_2 haciéndose el seguimiento de la transformación en los siguientes periodos de tiempo: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 y 24. El experimento se realizó de la siguiente manera:



- ❖ Se siguió el proceso de transformación de las células por microscopia de luz en un microscopio invertido. Para ello se tomaron 20 µl de células, se le añadió 20 µl de azul de tripano y se contaron 100 células cada vez en la cámara de Neubauer, Se contaron aquellas formas promastigotes, amastigotes y elipsoidales y se realizaron registros fotográficos.
- ❖ Finalmente los cultivos fueron transferidos nuevamente a sus condiciones iniciales de crecimiento a temperatura ambiente para observar su capacidad de diferenciación a la forma promastigote.

4.4 MEDIOS

4.4.1 Medio LIT:

Para cultivar los epimastigotes de *T. cruzi* se utilizó el medio Lit modificado (Infante, 1975). Composición:

Solución A:

Hidrolizado de Lactoalbúmina	2 gr
Triptosa	10gr
Extracto o infusión de hígado	2gr
Extracto de levadura	5 gr

Estos compuestos se disolvieron en 250 ml de agua bidestilada, precalentada a 60° C.

Solución B:

Glucosa	4gr
Cloruro de Sodio	9gr
Cloruro de Potasio	0,4gr
Fosfato dibásico de Sodio	7,5gr

Estos compuestos se disolvieron en 250 ml. en agua bidestilada.

Preparación: Se mezclaron las soluciones A y B, ajustando el pH a 7,2 con NaOH 1N. Se completó hasta un volumen final de 950 ml. con agua bidestilada. El medio se esterilizó por filtración, a través de una serie de filtros Millipore (prefiltro AP-20; membranas de 0,8; 0,45 y 0,22 μ m, separadores AP-32). La esterilidad se comprobó por incubación a 37°C por 24 h. Para su uso como medio de cultivo para *T. cruzi*, la preparación anterior se suplementó con Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado al 10% y Gentamicina.

4.4.2 Medio Schneider:

Para cultivar los promastigotes de *L. mexicana* se utilizó el medio Schneider (SIGMA), con L- glutamina, sin cloruro de calcio ni bicarbonato de sodio.

Preparación: Para preparar un litro de medio se mezcla un 80% de agua del volumen final requerido y agitando suavemente se añade el medio en polvo, hasta disolver completamente. Adicionalmente se añade 0,4 gr de bicarbonato de sodio por cada litro preparado, se ajusta el pH a 9,2 con hidróxido de sodio, mezclando suavemente por 10 minutos, luego se reajusta el pH a 6,7 con ácido clorhídrico 1 N, se añaden 0,6 gr de cloruro de calcio por cada litro de solución, mezclando rápidamente para evitar precipitación. Se ajusta el pH de 0.1-0,3 unidades de pH durante su filtración y se añade agua bidestilada hasta llegar al volumen final de un litro. Luego se filtra a través de un filtro Millipore de 0,22 μ m, se realizaron los controles

respectivos del medio y se conservó a 4 °C hasta su uso. Para ser usado como medio de cultivo se suplementa con 10 % de suero fetal bovino inactivado a 56°C y 100 µl de Gentamicina (1mg/ml).

4.4.3 Medio RPMI: Se utilizó RPMI 1640 de la casa GIBCO con L-Glutamina, sin Bicarbonato de Sodio y se le agregó 500 ml de agua bidestilada hasta disolver por completo; se añadió agua bidestilada hasta 750 ml y se agregó, agitando continuamente, 2 gr de Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3), hasta disolverlo completamente. Posteriormente se agregó 5,9 gr de Hepes y se llevó hasta un volumen final de un litro (1 L) con agua bidestilada. Luego de filtrar la solución con papel de filtro Whatman N° 1, se ajustó la solución a pH 7,6. Finalmente se filtró a través de un filtro Millipore de 0,22 µm y se conservó a 4 °C hasta su uso, y fue suplementado con 1% de Penicilina/ Streptomycin, 1% de Glutamina y 10 % de SFB sin inactivar.

4.4.4 Medio DMEM: Se utilizó el medio de cultivo celular Dulbecco, medio Eagle modificado (DMEM) de SIGMA, con L-Glutamina y 1000 mg de Glucosa / litro, sin rojo de Fenol, ni Bicarbonato de Sodio. Se partió de un frasco de 10 gr para la preparación de un litro de medio, de la siguiente manera. Inicialmente se disuelve en un 80% del volumen final agitando suavemente, adicionalmente se suplementa con 3,7 gr/litro de bicarbonato de sodio agitando constantemente, se ajustó el pH 7,2-7,4 con HCl 1 N / NaOH. Luego se filtró a través de un filtro estéril Millipore de 0,22 µm, se realizaron

las respectivas pruebas de esterilidad y se conservó a 4 °C hasta su uso, cuando se suplementó con 1% de Penicilina/ Streptomicina, 1% de Glutamina y 10 % SFB sin inactivar.

5. Resultados

5.1 Curva de crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* en medio Schneider.

La curva de crecimiento de *L. mexicana* (cepa NR) se inició partiendo de un inóculo de 2×10^6 promastigotes/ml. Los resultados obtenidos muestran la curva típica de crecimiento celular de estos parásitos, con la excepción de una muy corta latencia, debido a que los parásitos están adaptados al medio de cultivo Schneider, la fase exponencial de crecimiento, hasta aproximadamente las 48 horas de cultivo donde alcanza unos 8×10^7 promastigotes/ml, seguida por una fase estacionaria donde el crecimiento se hizo más lento y hacia las 96 horas donde se inicio la muerte celular progresiva de los promastigotes (no mostrado en la gráfica) por la disminución de las fuentes de energía en el medio (Fig. 12). Estos ensayos se realizaron por triplicado y se mostraron uno de los datos.

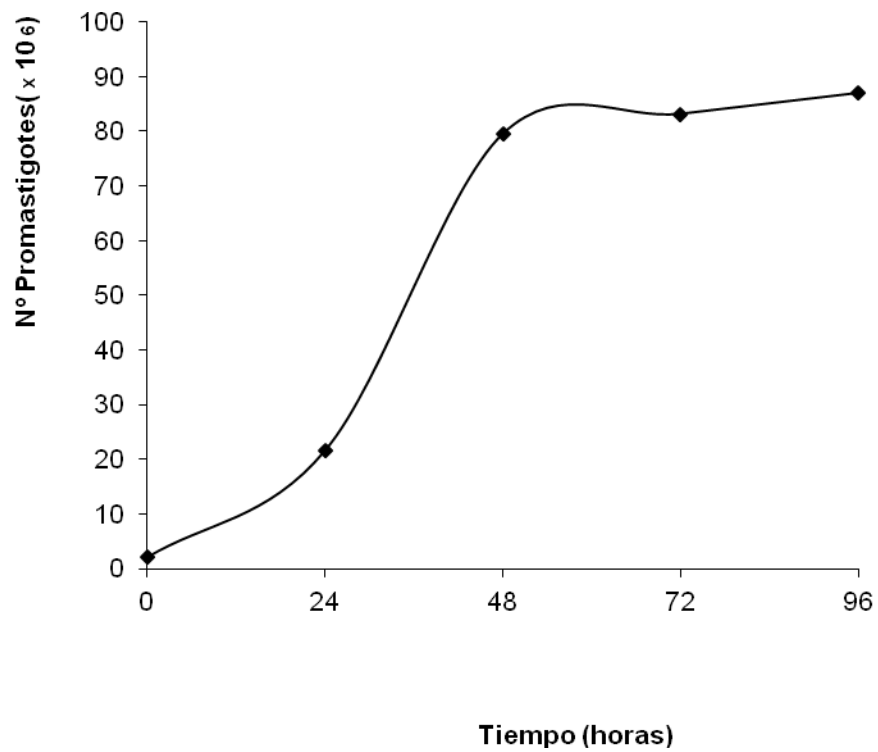


Figura 12. Curva de crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* en medio Schneider suplementado con 10% SFB.

5.2 Efecto del Diazepam sobre la proliferación de los promastigotes de *L. mexicana*.

El Diazepam inhibe la proliferación de los promastigotes de *L. mexicana* en forma dosis dependiente de la concentración, produciéndose cambios en la morfología que se muestran en el próximo objetivo, los cuales se realizaron por registros fotográficos con una cámara, a partir de las 24 horas de tratamiento y una total inhibición del crecimiento a los 90µg/ml. El rango de concentraciones de Diazepam utilizado varió desde 30 µg /ml a 90 µg/ml de la droga (Fig. 13). El CI_{50} estimado a través del programa Sigma Plot fue de 36,25µg/ml a las 48 horas de incubación con la droga (Fig. 14). Estos ensayos se realizaron por triplicado, mostrándose solo uno de ellos.

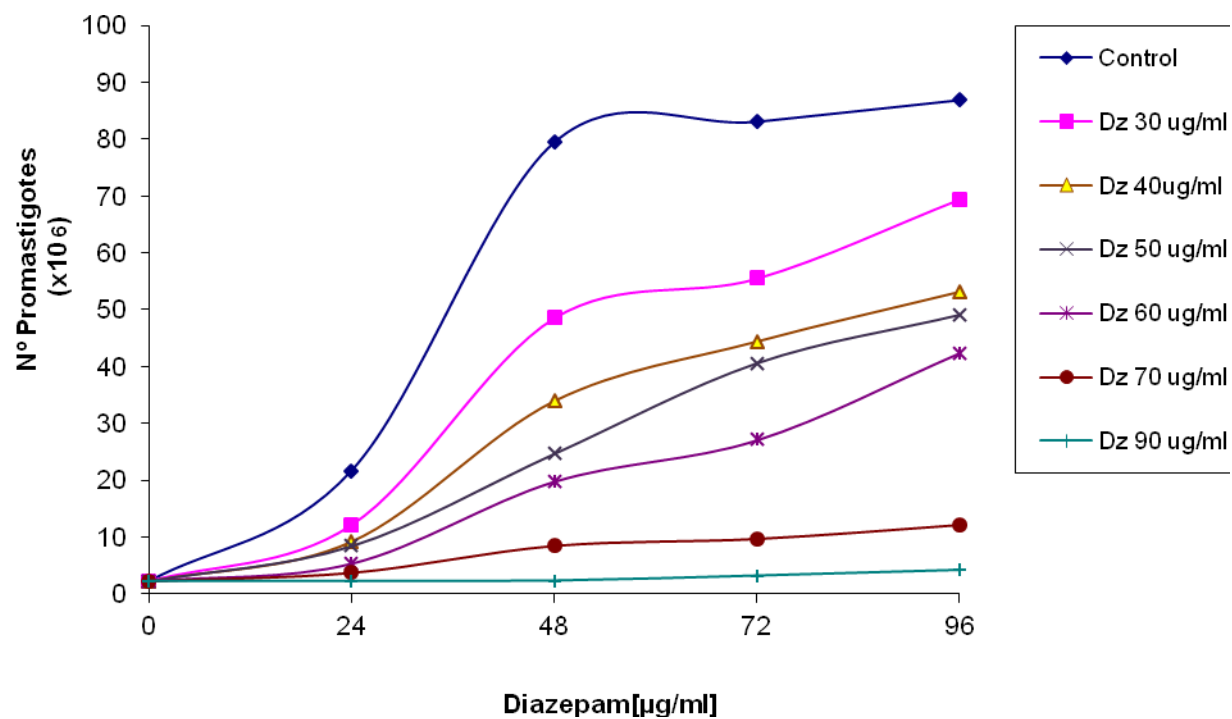


Figura 13. Acción antiproliferativa del Diazepam sobre los promastigotes de *L. mexicana* (cepa NR).

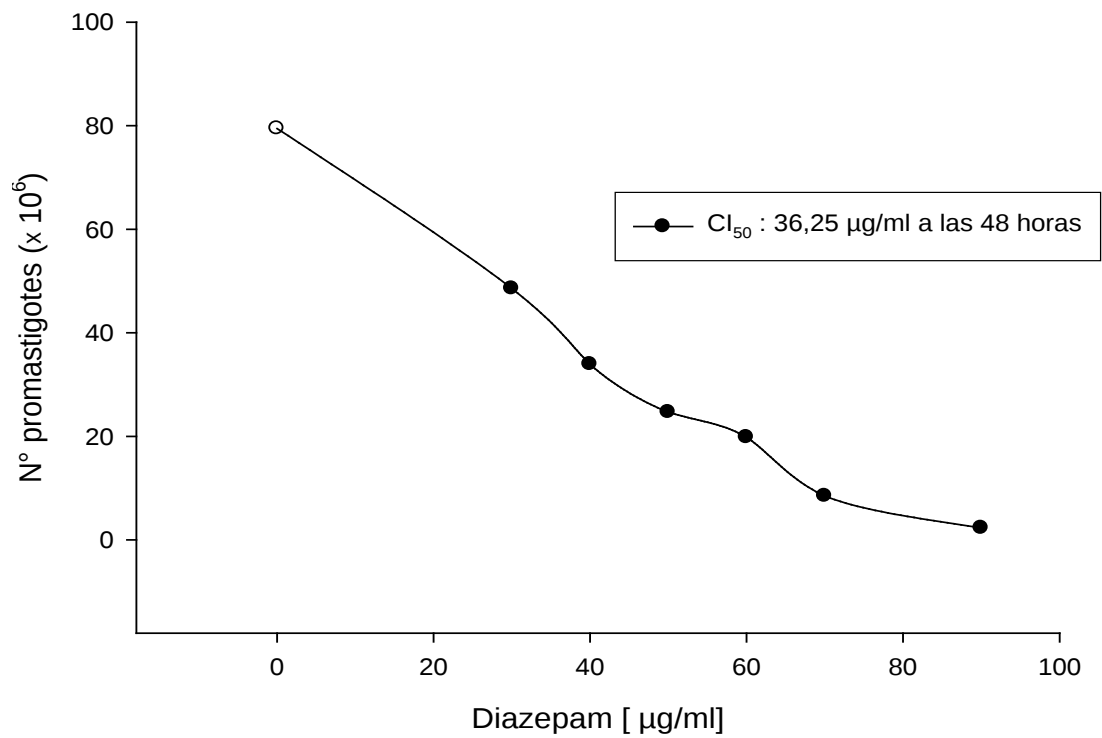


Figura 14. Curva dosis respuesta a las diferentes concentraciones del Diazepam a las 48 horas de incubación. Determinación del CI_{50}

5.3 Efecto del Diazepam sobre la morfología de los promastigotes de *L. mexicana* (cepa NR)

A través del microscopio de luz se pudo observar que los promastigotes sometidos al tratamiento con Diazepam sufrieron cambios notables en su morfología, de la forma alargada típica del promastigote, a una forma elipsoidal o redondeada con presencia de dos flagelos de diferente longitud o con un solo flagelo de dimensiones disminuidas. En algunos promastigotes se observaron formas elipsoidales y la ausencia de flagelo libre (Fig. 15). En la zona anterior y media del cuerpo del promastigote se observó un área muy refringente, probablemente causada por la presencia de vacuolas o alteraciones de la mitocondria.

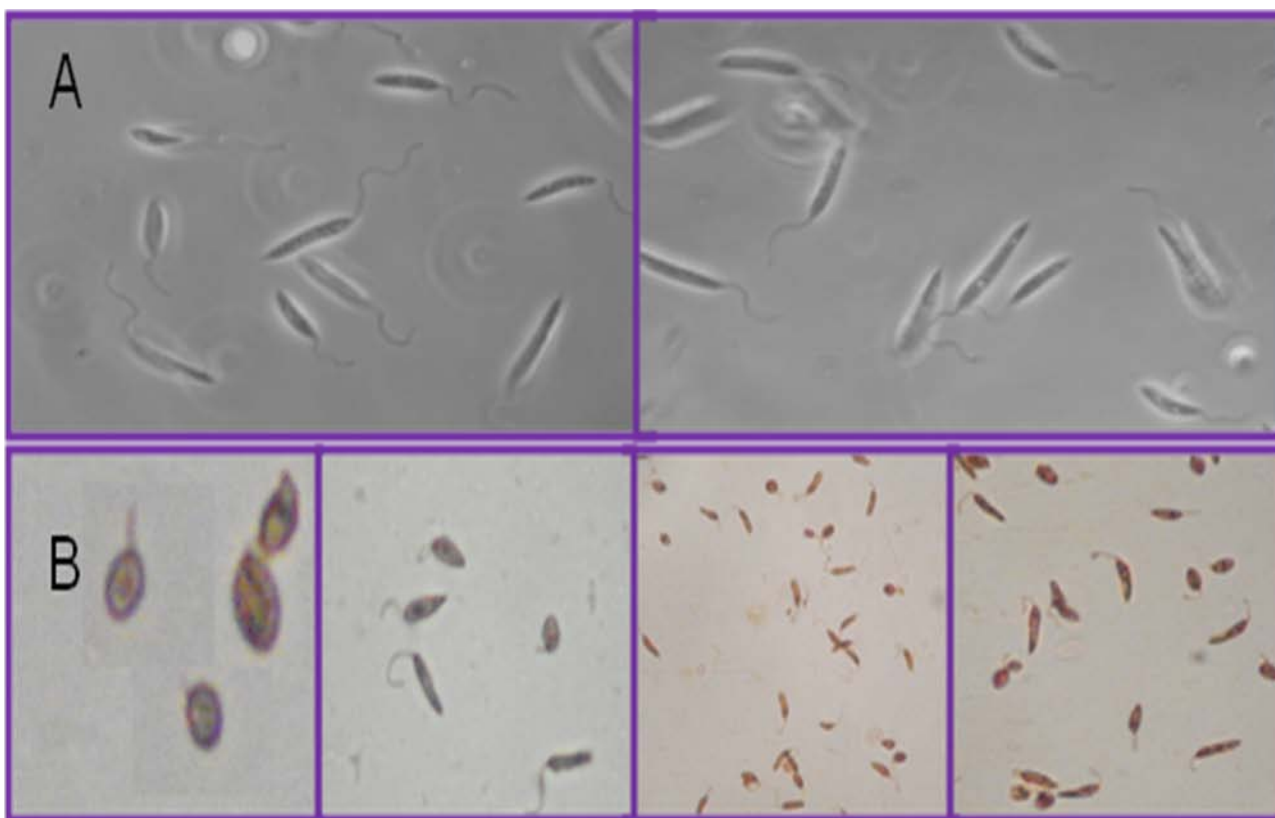


Figura 15. Cambios en la morfología de los promastigotes de *L. mexicana* (cepa NR) tratadas con Diazepam a una concentración de 45µg/ml a las 48 horas de incubación. **A)** Promastigotes control. 400X. **B)** Tratadas con 45µg/ml de Diazepam 400X

5.4 Ensayo de citotoxicidad del Diazepam sobre promastigotes de *L. mexicana*. Determinación del CI_{50} .

Para estimar el efecto citotóxico del Diazepam *in vitro* sobre los promastigotes de *L. mexicana* se evaluaron diferentes concentraciones de esta droga, mediante el ensayo con MTT. En los resultados obtenidos mediante el programa Origin 6, se muestra claramente el incremento de la reducción del MTT de manera dosis dependiente (Fig. 16), obteniéndose 100% de reducción a una concentración de 100µg/ml. A partir de estos datos se calculó la concentración para la cual se alcanza una reducción del 50%, a través del software GraphPad, el cual arroja el valor directamente, obteniéndose un CI_{50} de 27,98µg/ml. Estos ensayos se realizaron por cuadruplicado y se realizó un promedio de los valores obtenidos, mostrándose en las gráficas las desviaciones estándar.

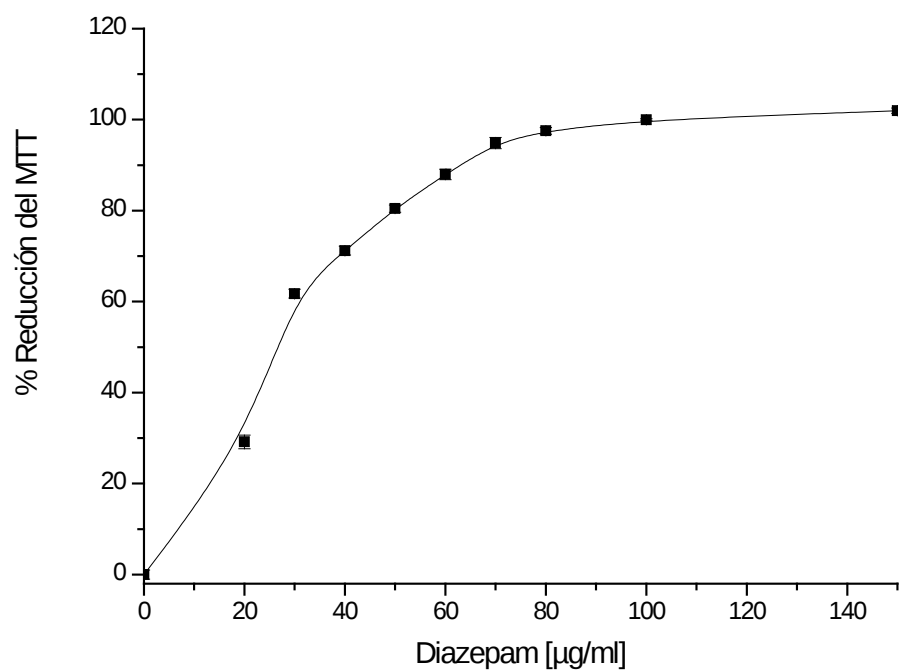


Figura 16. Representación gráfica de la citotoxicidad del Diazepam sobre promastigotes de *L. mexicana* a las 48 horas de incubación, Ensayo con el MTT

5.5 Citotoxicidad del Diazepam sobre la línea de macrófagos J774.

Determinación del CI_{50} .

Se evaluó la actividad citotóxica del Diazepam sobre la línea de macrófagos J774 mediante el ensayo con MTT. El valor del CI_{50} obtenido fue de 158,85µg/ml, alrededor de cinco veces mayor que el obtenido para los promastigotes de *L. mexicana* (Fig. 17). El porcentaje de reducción resultó siempre menor al 10%, en el rango de las concentraciones evaluadas, hasta 110µg/ml donde comienza a ser tóxico para estas células. Estos ensayos se realizaron por triplicado y se realizó un promedio de los valores obtenidos, mostrándose en las gráficas las desviaciones estándar.

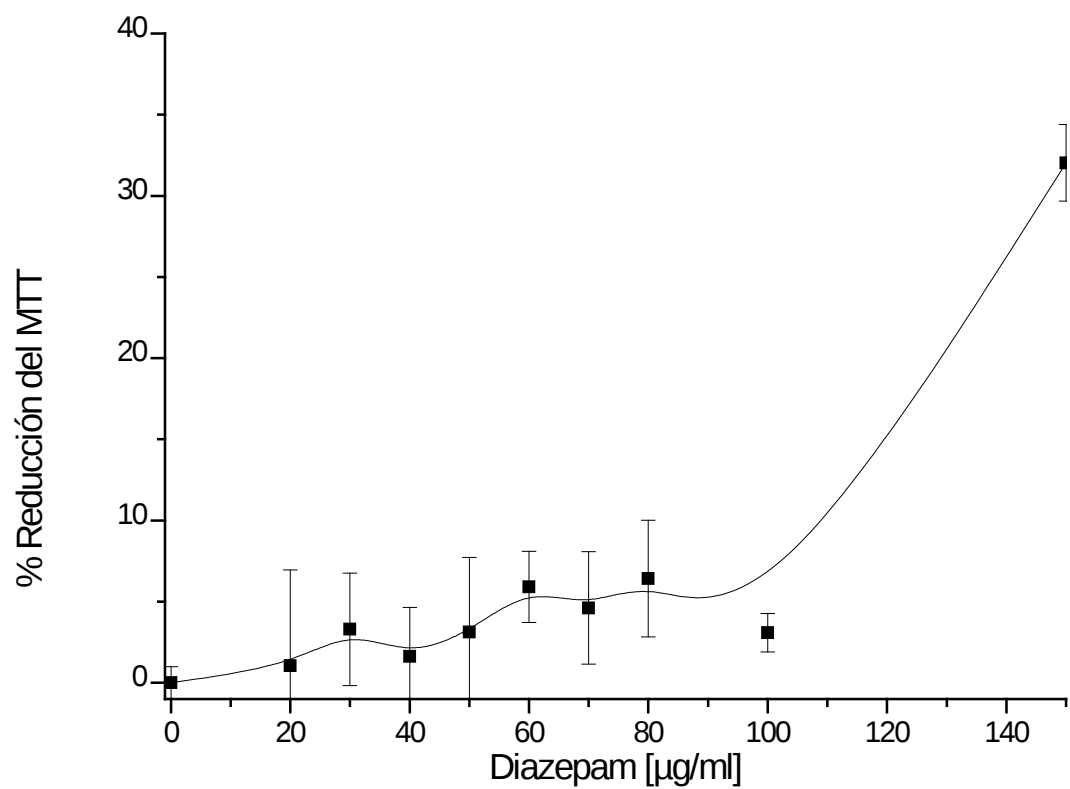


Figura 17. Representación gráfica de la citotoxicidad del Diazepam sobre macrófagos línea J774 a las 48 horas de incubación mediante el MTT.

5.6 Efecto del Diazepam sobre el proceso de infección de *L. mexicana* en macrófagos de la línea J774.

Para evaluar la acción del Diazepam sobre el proceso de infección de los macrófagos se realizaron dos ensayos: el primero consistió en infectar los macrófagos añadiendo diferentes concentraciones de Diazepam, simultáneamente con los parásitos, en la relación estipulada previamente de 10:1 (parásitos/ macrófagos). Los resultados obtenidos lo podemos observar en la figura 18, los cuales mostraron una disminución del porcentaje de infección hasta un 40% para una concentración de la droga de 75 µg/ml y hasta un 15 %, para una concentración de 90 µg/ml.

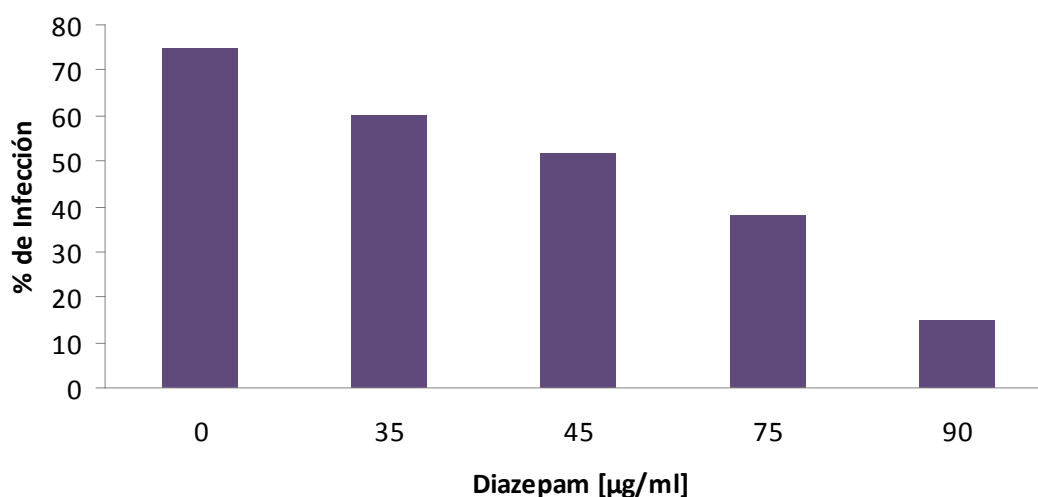


Figura 18. Efecto del Diazepam a diferentes concentraciones sobre el proceso de Infección de los macrófagos.

En el segundo ensayo los promastigotes *de L. mexicana* se trataron con Diazepam a una concentración de 45 µg/ml, por 48 horas. Estos promastigotes se utilizaron para realizar la infección de los macrófagos manteniendo la relación 10:1 parásitos /macrófago. Los resultados se muestran en la figura 19, donde se observó una disminución en el porcentaje de infección de un 35% con respecto al control.

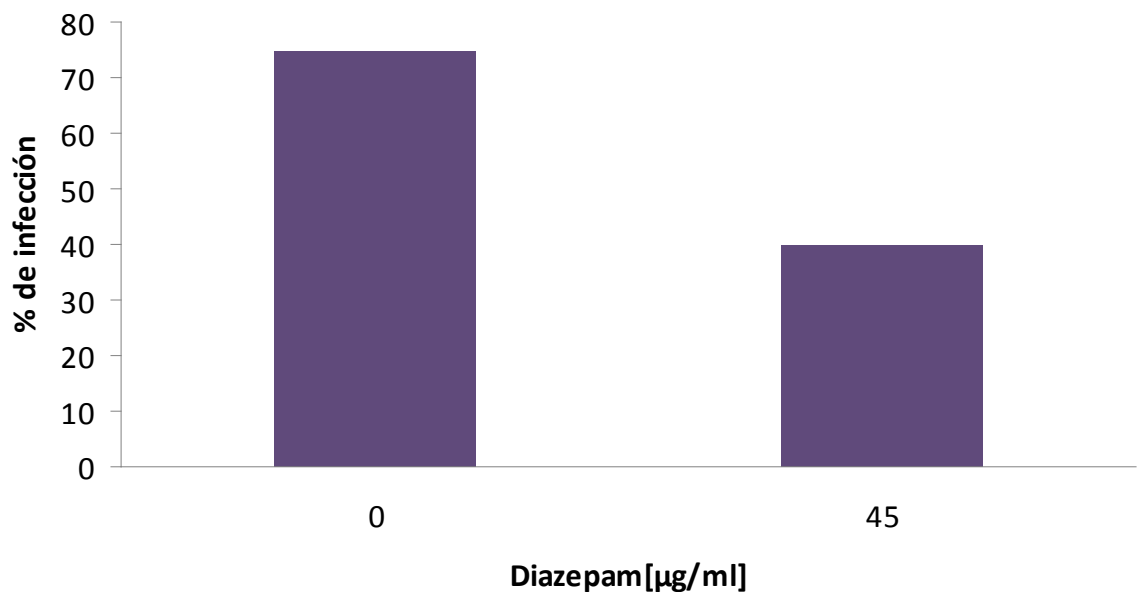


Figura 19. Efecto del tratamiento previo de los promastigotes con Diazepam sobre el proceso de Infección de los macrófagos.

5.7 Actividad del Diazepam sobre los amastigotes de *L. mexicana* en macrófagos de la línea J774

Para estimar la toxicidad del Diazepam, sobre amastigotes de *L. mexicana* en macrófagos y así determinar la capacidad de la droga de eliminar la infección parasitaria, se añadieron los parásitos a los macrófagos en la relación de parásito/macrófago estipulada y se incubaron por 24 horas, en la cámara de crecimiento a 37 °C y 5% CO₂. Al observarse que los parásitos habían sido internalizados por los macrófagos y luego de eliminarse los parásitos no internalizados, se determinó en primer lugar el porcentaje de infección en el cultivo control, el cual alcanzó un 75%. En los otros pozos se procedió a aplicar el tratamiento con el Diazepam a concentraciones de 45 µg/ml y 75 µg/ml; determinándose el % de infección en cada caso. Los métodos obtenidos muestran una disminución de la infección de 35% a una concentración de 45 µg/ml y de un 41 % a una concentración de la droga de 75 µg/ml, como se puede visualizar en la figura 20. En ninguno de los ensayos realizados con las diferentes concentraciones de Diazepam, se afectó la integridad del macrófago infectado, como se puede observar en la Figura 21.

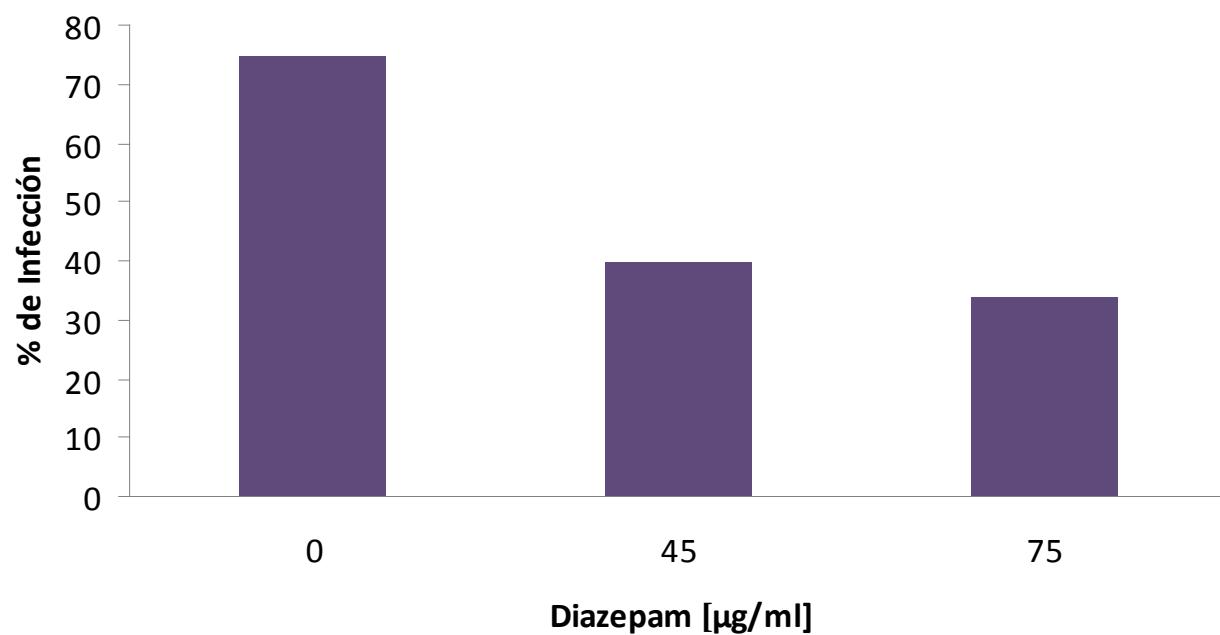
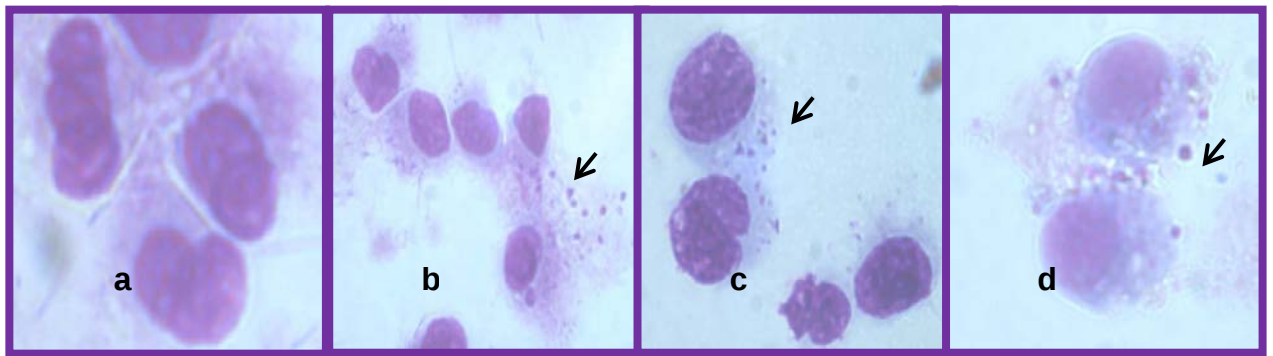
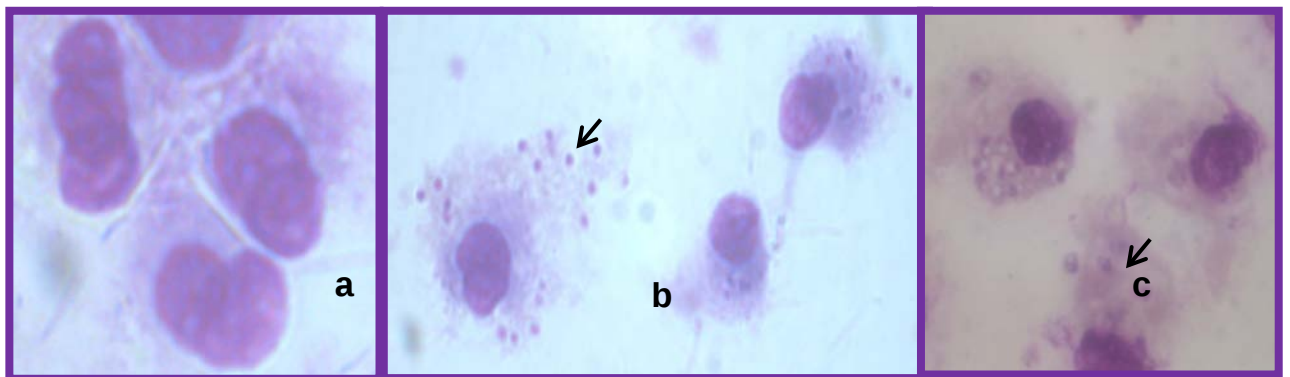


Figura 20. Efecto del Diazepam sobre amastigotes de *L. mexicana* internalizados en macrófagos de la línea J744. G8.



A



B

- Figura 21. A Infección de los macrófagos con promastigotes de *L. mexicana* simultáneamente con el Diazepam. a.** Macrófagos sin infectar; **b** Diazepam 35 µg/ml; **c** Diazepam 45 µg/ml; **d** Diazepam 75 µg/ml. **B Tratamiento de los macrófagos infectados con Diazepam. a** Macrófagos sin infectar; **b** Macrófagos con Diazepam 45 µg/ml y **c** Macrófagos con Diazepam 75 µg/ml. Las flechas indican los amastigotes dentro del macrófago.

5.8 Efecto del Diazepam sobre el proceso de diferenciación en *L. mexicana*.

Los resultados del proceso de diferenciación de promastigotes de *L. mexicana* a la forma amastigote en células tratadas y no tratadas, se pueden observar en la figura 22. Las diferencias en la morfología, fueron usadas para diferenciar tres tipos de morfología que prestablecimos previamente, los cuales fueron promastigotes de forma alargada, delgadas con ambos extremos agudizados, flagelo libre motil; las formas elipsoidales eran más pequeñas con ambos extremos redondeados y los microamastigotes de tamaño más pequeños y redondeados sin flagelo externo visible de la forma promastigote a la forma amastigote. Al hacerle seguimiento al proceso de transformación vimos que en las células no tratadas (Fig. 22a), a la hora y media de incubación a 34 °C aproximadamente el 50% de las células presentaron forma elipsoidal y a las siete horas hay un porcentaje similar de formas elipsoidales y microamastigotes y ausencia de promastigotes, completándose la transformación total entre ese lapso de tiempo y las 24 horas. Cuando las células se incuban a 34°C en presencia de 20 ug /ml de la droga (Fig. 22b) a las 24 horas hay aproximadamente un 70% de forma microamastigote y un 30 % de forma elipsoidal, mientras que en la presencia de 36 µg/ml de la droga a las 24 horas (Fig. 22c) se obtuvo aproximadamente porcentajes cercanos a 50% de células elipsoidales y microamastigotes. En presencia de una concentración de 45 µg/ml, la forma

promastigote está ausente a las tres horas de la incubación y el 90% tiene forma elipsoidal la cual se mantuvo en un 60% a las 24 horas junto a una población de un 40% de microamastigotes (Fig. 22 d). Las células control luego de 24 de haber sido transferidas a 27 °C recuperaron su forma alargada y motil típico de los promastigotes y reiniciaron su proceso de división. Las tratadas con 20 µg /ml retardan un poco su proceso de transformación, mientras que las tratadas con las concentraciones superiores a esta no se reversionaron y hay un proceso de muerte celular. En las fotografías que se muestran en la Fig. 23 se puede observar los cambios de forma que se produjeron.

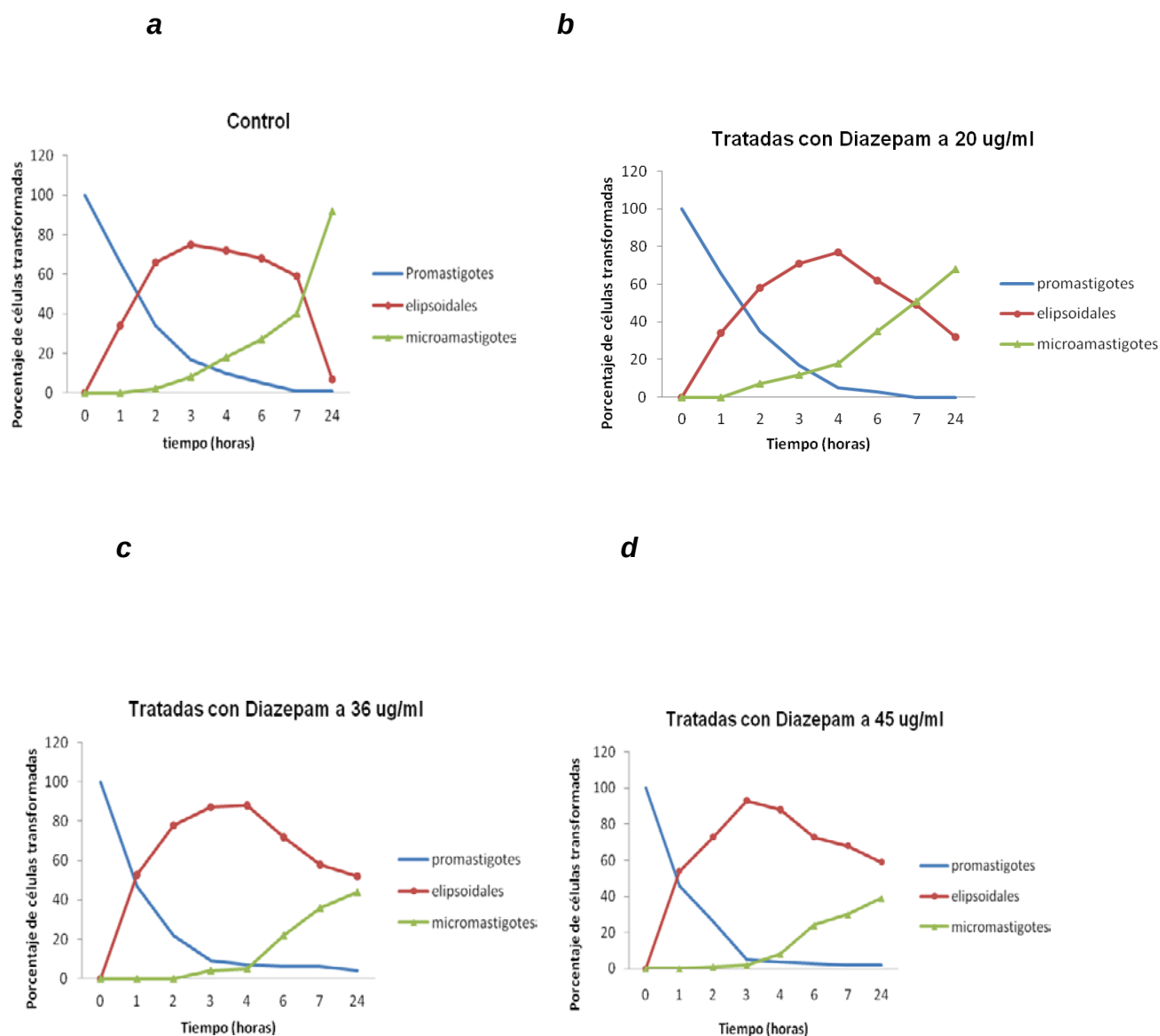
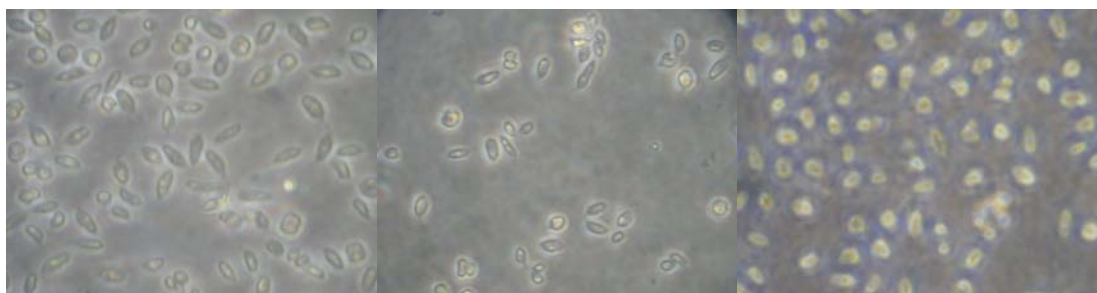


Figura 22. Transformación de la forma promastigote a la forma amastigote a 34°C. a) Transformación de las células control, **b)** Transformación de promastigotes tratados con Diazepam a 20 $\mu\text{g/ml}$, **c)** Transformación de promastigotes tratados con Diazepam a 36 $\mu\text{g/ml}$.

Registros fotográficos de la transformación de los parásitos de la forma promastigotes a amastigotes a diferentes tiempos.

A) Promastigotes control

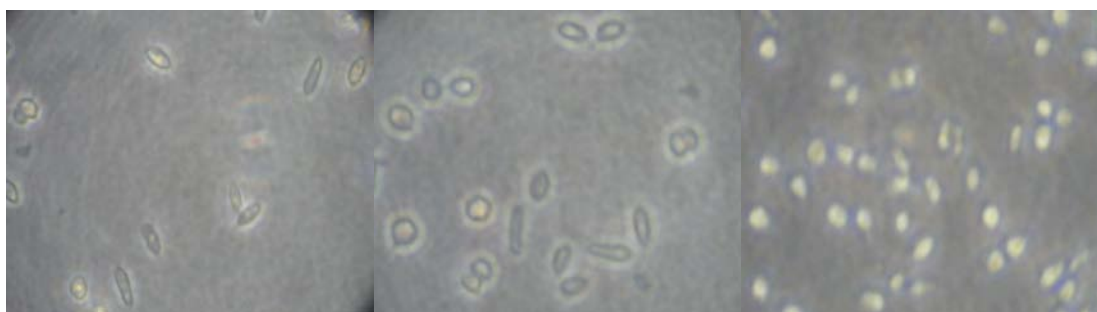


6h

12h

24h

B) Promastigotes tratados con Diazepam 45 µg/ml



6h

12h

24h

Figura 23. Efecto del Diazepam sobre el proceso de diferenciación de la forma promastigote a la forma amastigote de *L. mexicana*. A) Promastigotes control, **B)** Promastigotes tratados con Diazepam 45 µg/ml.

5.9 Estimación cualitativa del potencial eléctrico transmembrana mitocondrial con Rodamina 123 en promastigotes de *L. mexicana*.

En la figura 24 se pueden observar promastigotes de *L. mexicana* (incubación control) tratados con rodamina 123. En la imagen se puede observar la fluorescencia. El grado de fluorescencia obtenidos para las células control (Fig. 24) y las incubadas con Diazepam a 45 µg/ml por 48 horas (Fig.25) son similares. Se observó una disminución en el número de parásitos por efecto del tratamiento con la droga. El resultado obtenido con los promastigotes de *L. mexicana* tratados con Diazepam (Fig. 25), indica que el potencial transmembrana no se vió afectado por la aplicación de la droga.

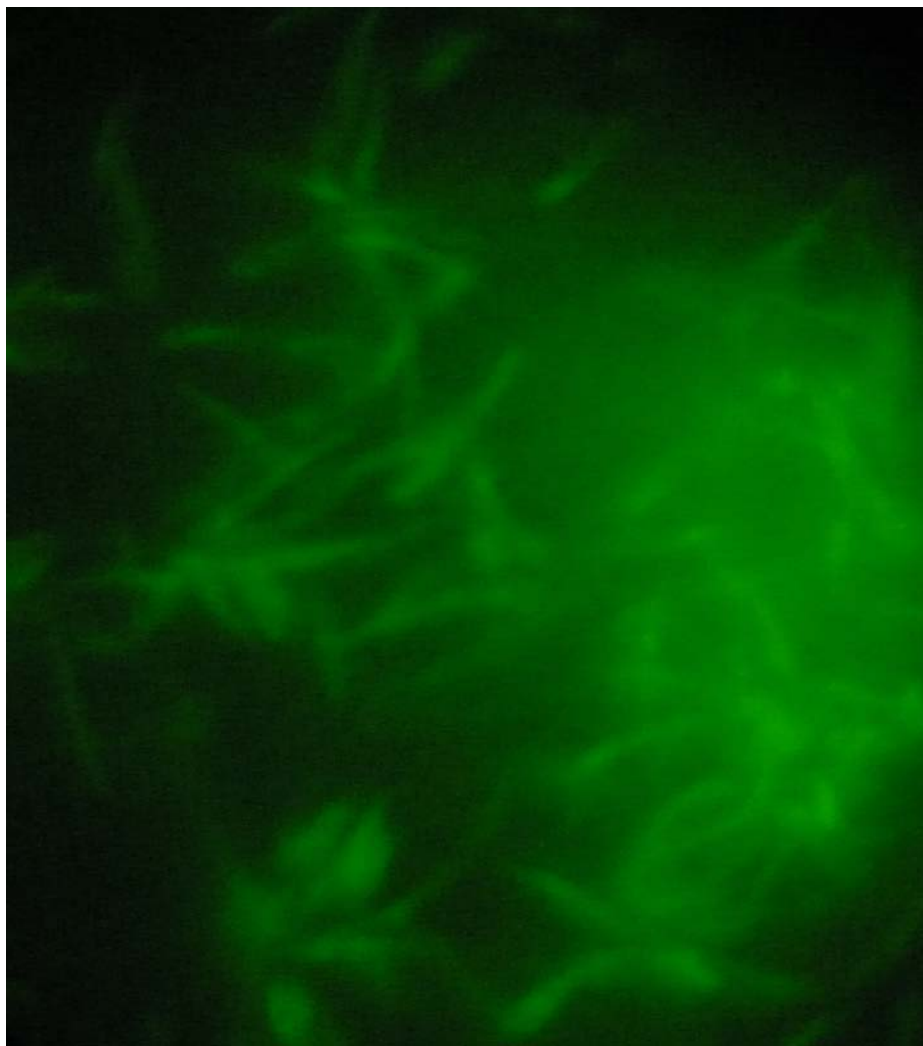


Figura 24. Promastigotes de *L. mexicana* control, tratados con rodamina 123; (400X)

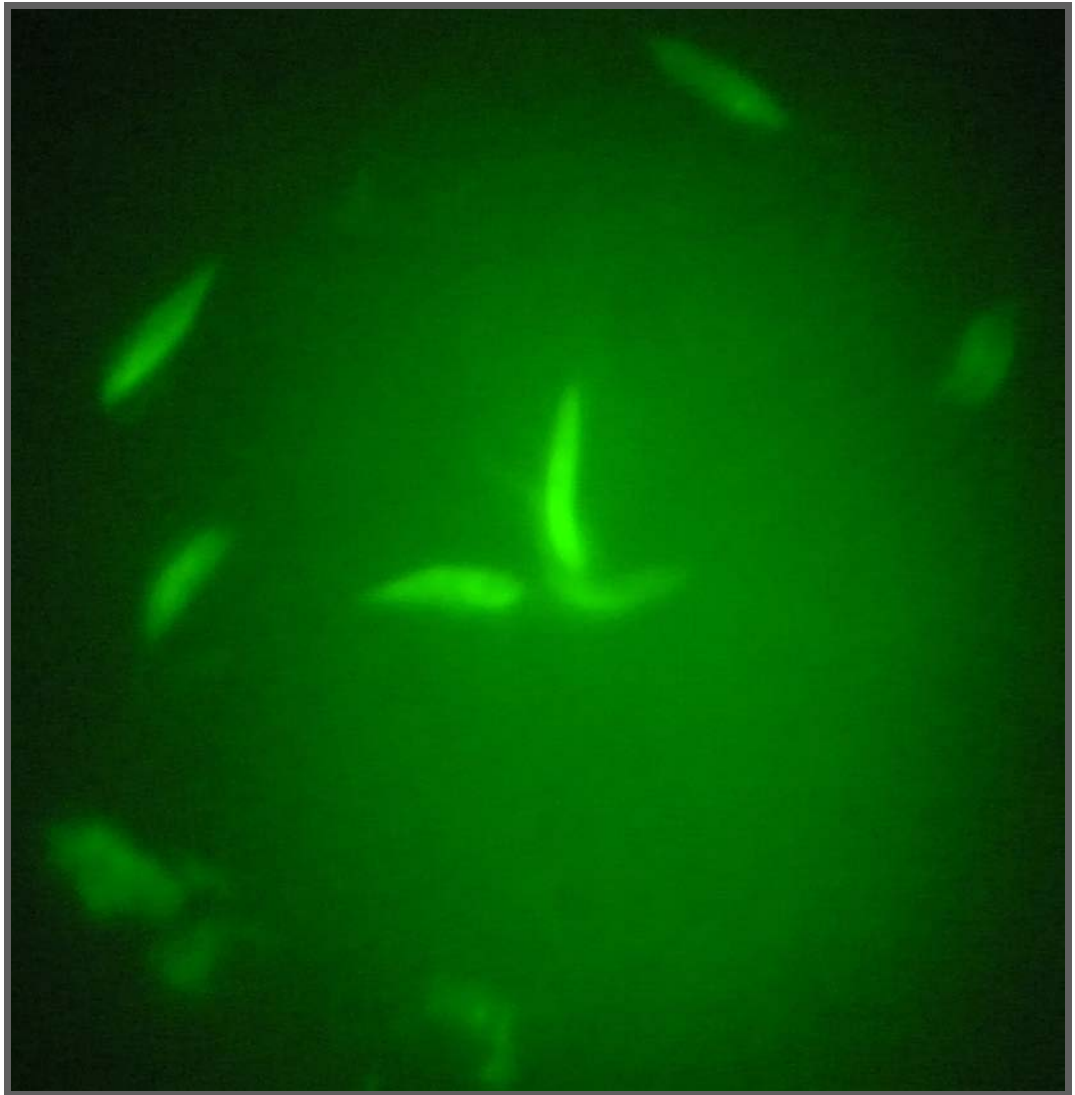


Figura 25. Promastigotes de *L. mexicana* incubados con Diazepam a 45 ug/ml por 48 horas y tratados con Rodamina 123. (400X)

5.10 Efecto del Diazepam sobre la ultraestructura de los promastigotes de *L. mexicana* (NR)

En la figura 26 se observa la ultraestructura de un promastigote sin tratamiento con Diazepam. Los promastigotes de *L. mexicana*, a las 48 horas de haber sido tratadas con el Diazepam, a una concentración de 45 µg/ml, presentaron cambios importantes en su ultraestructura. Las células se observan generalmente en forma de pera o redondeadas, con la red de microtúbulos subpeculiares no alterada y la presencia de un solo núcleo (Fig. 26b). El mitocondrion presentan arreglos particulares de las crestas mitocondriales en formas circulares y de óvalos o matriz reticular (Figs. 26 d,e,f). El kinetoplasto presentó evidencias de alteración de su arreglo característico, como es la disminución de su estructura compacta de fibras, y sin indicios de división (Figs. 26d, e f). No se observó ninguna de las células en proceso de división. Generalmente están presentes uno o dos cuerpos basales muy cercanos uno de otro correspondiente a la presencia de uno o dos flagelos (Fig. 26b). Fueron evidentes la presencia de alteraciones de la morfología flagelar particularmente la depolimerización parcial del par central de los microtúbulos central del axonema. La bolsa flagelar dilatada presenta numerosas vesículas conteniendo material granular y vesicular (Fig. 26b, 26f). La zona comprendida entre los cuerpos basales y la membrana del

mitocondrión, que limita el Kinetoplasto, presenta alteraciones o carencia del material fibrilar que los conecta evidenciado por una disminución o pérdida de la conexión entre estas estructuras induciendo un desplazamiento del mitocondrión (Fig. 26c y 26g).



Figura 26 a. Corte longitudinal de promastigotes sin tratamiento. Se observa el núcleo (N) típicamente presenta un nucleolo (n) electrodenso, ácidocalcisomas (A), la mitocondria (Mit), el Kinetoplasto (Kt), el flagelo (f) y la bolsa flagelar (bf).

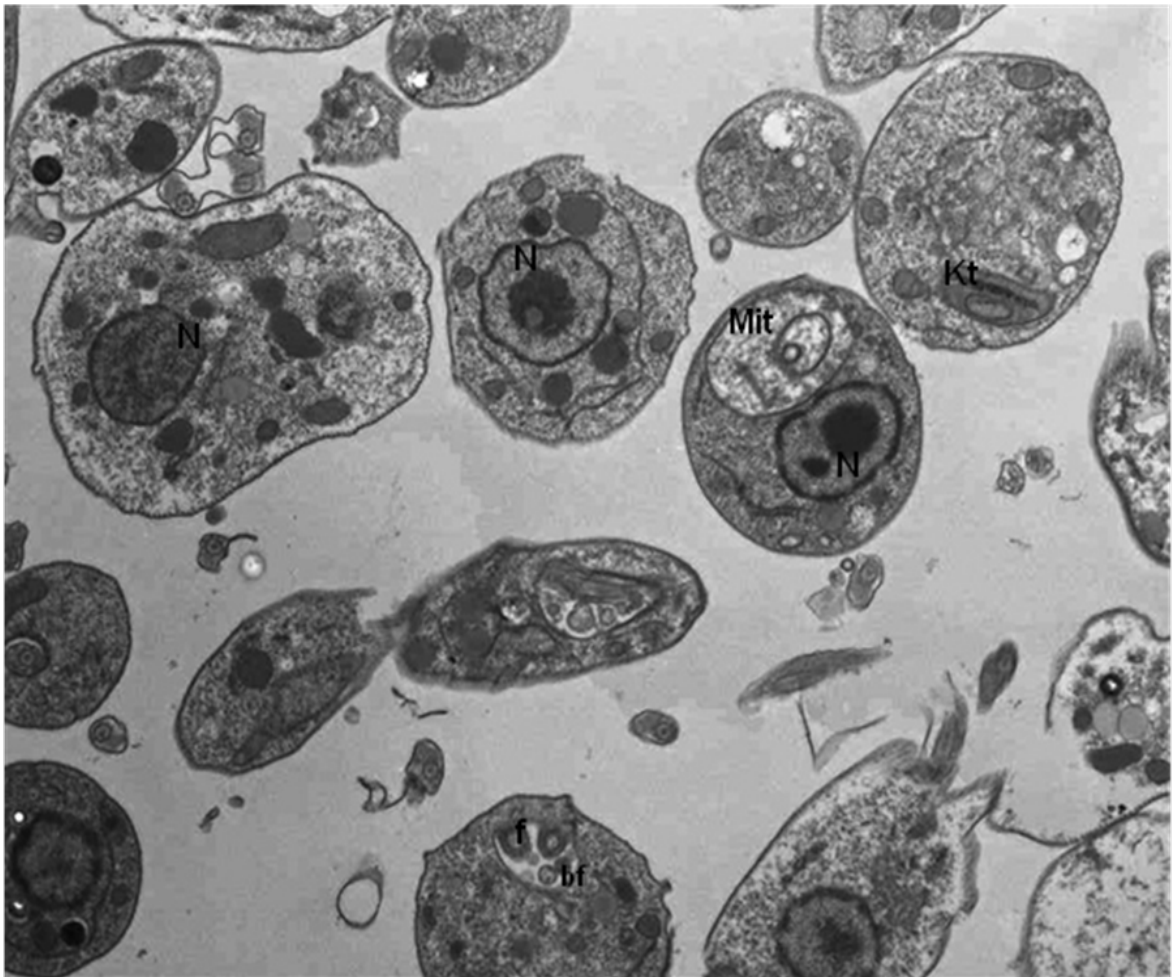


Figura 26 b. Micrografía panorámica de promastigotes tratados con Diazepam a 45µg/ml por 48 horas. Las células de formas esféricas u ovaladas, el núcleo (N) no presentaron alteraciones visibles y se observa un solo núcleo, la mitocondria (Mit) se observa alterada, así como la bolsa flagelar (bf) contiene material vesicular, con la presencia hasta de hasta 2 flagelos (f)



Figura 26 c. Micrografía de promastigotes tratados con Diazepam a 45 $\mu\text{g/ml}$ por 48 horas, se aprecia un solo núcleo (N), el Kinetoplasto (Kt) intacto y se pudo evidenciar el cuerpo basal (cb) y la bolsa flagelar (bf). Nótese la pérdida de conexión entre la bolsa flagelar y el mitocondrion conteniendo el Kt.

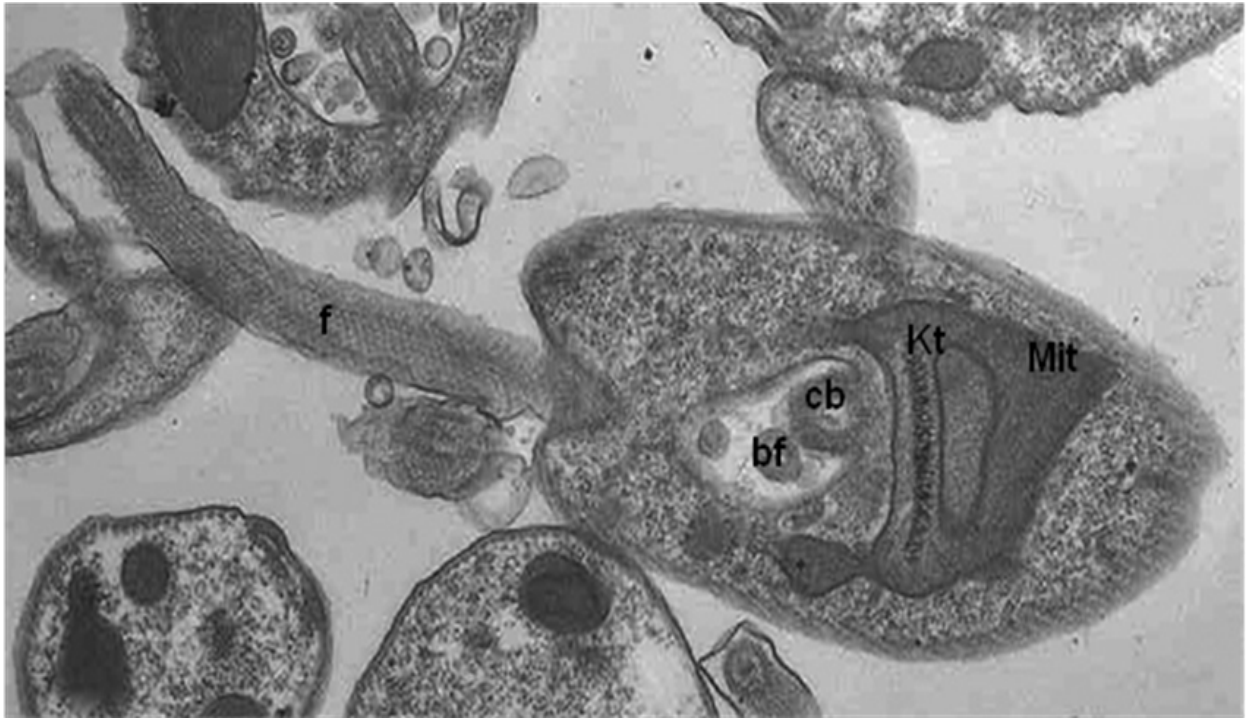


Figura 26 d. Micrografía de un promastigote tratado con Diazepam a 45 $\mu\text{g/ml}$ por 48 horas. Promastigote de forma ovalada, se observó el Kinetoplasto (Kt) y se pudo evidenciar que al mitocondrion (Mit) con una vesícula en el interior, el cuerpo basal (cb) y la bolsa flagelar (bf) con material vesicular y un solo flagelo (f).

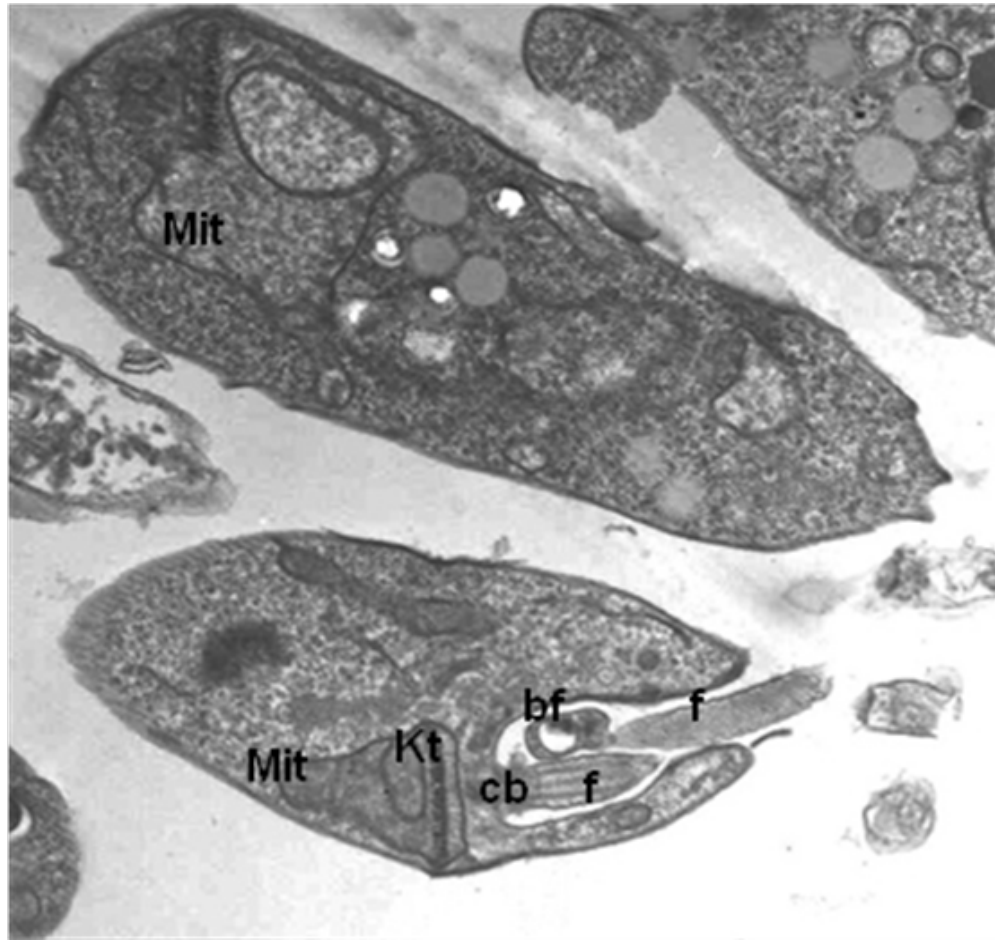


Figura 26 e. Micrografía de una célula tratada con Diazepam a 45 $\mu\text{g/ml}$ por 48 horas, promastigote de forma ovalada, se observó el Kinetoplasto (Kt) y la mitocondria (Mit) presentó alteraciones, forma reticular y estructura en forma de vesícula en su interior, dos flagelos (f), el cuerpo basal (cb) y la bolsa flagelar (bf).

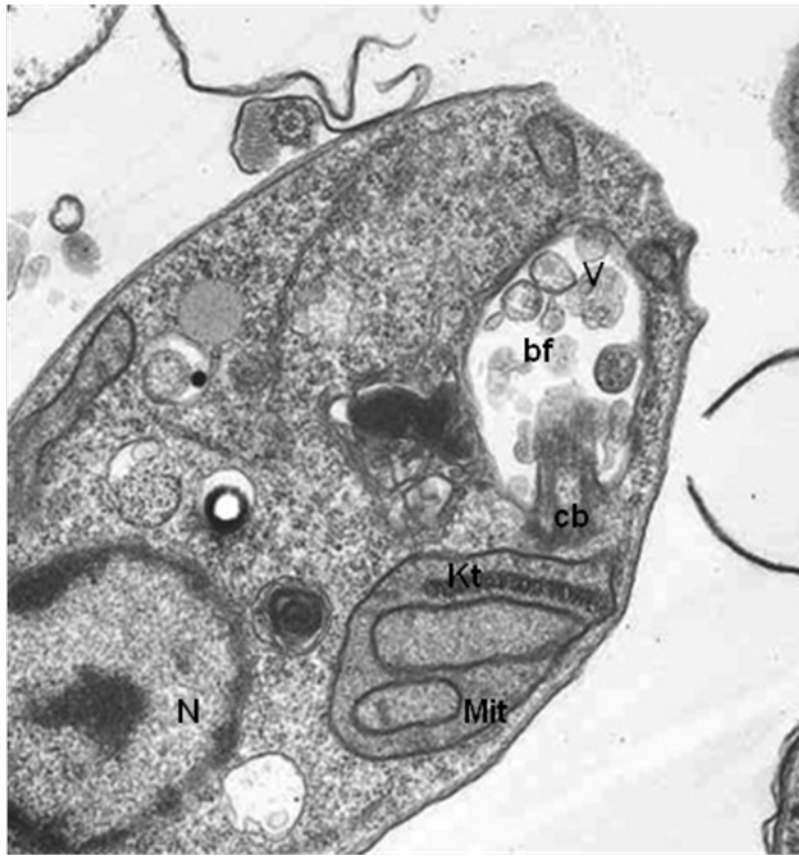


Figura 26 f. Micrografía de un promastigote tratado con Diazepam a 45 $\mu\text{g/ml}$ por 48 horas, se aprecia promastigote de forma ovalada, el Kinetoplasto (Kt), el mitocondrion (Mit) presentó arreglos en forma de vesículas en su interior, el cuerpo basal (cb) con alteraciones en su arreglo interno y bolsa flagelar dilatada (bf) con vesículas.



Figura 26 g. Micrografía de una célula tratada con Diazepam a 45 $\mu\text{g/ml}$ por 48 horas. Promastigote de forma ovalada, se observa separación del mitocondrion conteniendo el Kinetoplasto (Kt), la mitocondria (Mit) presenta crestas en forma de retículos .Cuerpo basal (cb) y el flagelo (f) con alteraciones severas.

5.11 Curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* en medio LIT suplementado.

La curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Biomed – Cepa Y) se inició partiendo de un inóculo de 3×10^6 epimastigotes/ml. En la figura 27 se muestra la curva de crecimiento celular seguida por estos parásitos. Se pudo evidenciar en la gráfica A correspondiente a la Cepa Biomed la fase de latencia hasta aproximadamente las 48 horas, debido a que los parásitos provenían de ser mantenidos en medio RPMI y en el laboratorio se cultivaron en medio Lit, luego se pudo observar la fase exponencial donde el cultivo alcanzó unos 10×10^6 epimastigotes/ml aproximadamente a las 96 horas, tiempo de seguimiento del cultivo. Con la cepa Y como se observó en la gráfica B, los epimastigotes se multiplicaron de forma exponencial hasta alcanzar a las 96 horas 16×10^6 epimastigotes/ml. Estos ensayos se realizaron por triplicado y se mostro uno solo de los resultados.

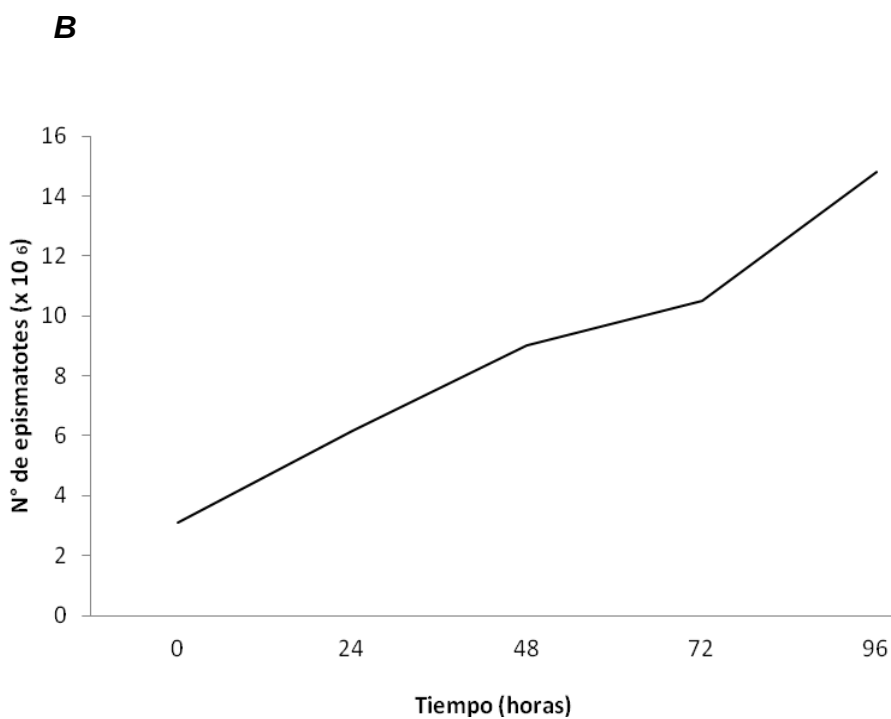
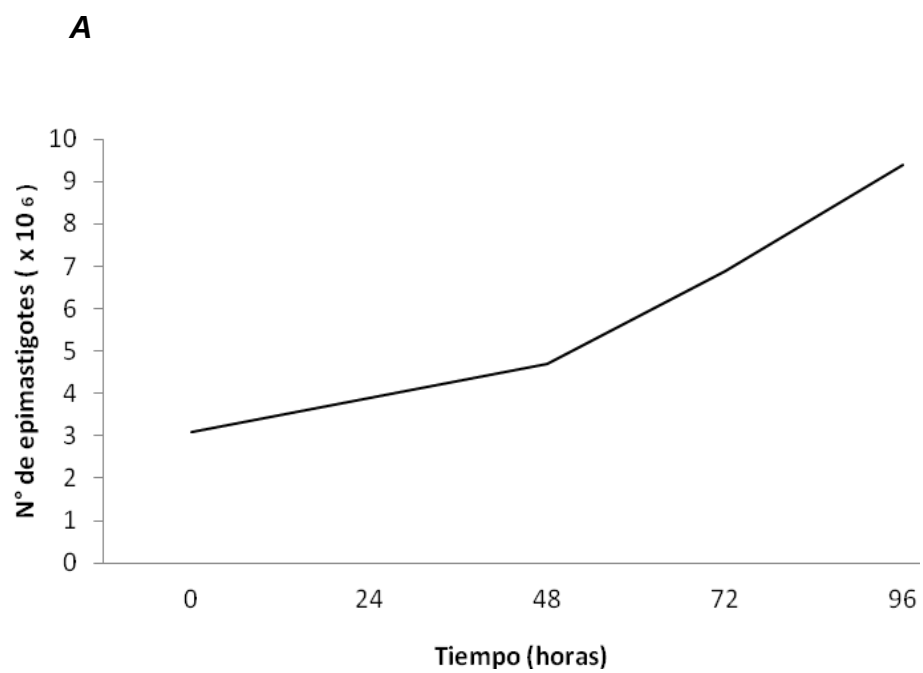
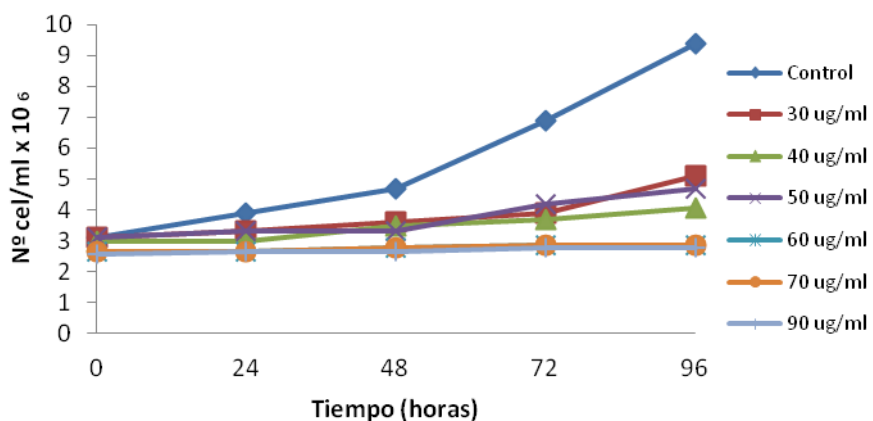


Figura 27. Curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* en medio Lit suplementado con 10% SFB. A. Cepa Biomed; B. Cepa Y

5.12 Efecto del Diazepam sobre la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* (Cepa Biomed – Cepa Y).

El Diazepam inhibió la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* tanto en la cepa Biomed como en la cepa Y, de forma dosis dependiente de la concentración, produciendo algunos cambios en la morfología típica a partir de las 24 horas de tratamiento y una total inhibición del crecimiento a los 90 µg/ml. El rango de concentraciones de Diazepam utilizado varió desde 30 µg /ml a 90 µg/ml. (Figura 28). El CI_{50} estimada a través del programa Sigmaplot fue de 44,05 µg/ml para la Cepa Biomed y de 57,06 µg/ml para la Cepa Y (Fig. 29), a las 48 horas de incubación con la droga. Estos ensayos se realizaron por triplicado mostrándose uno solo de los tres resultados.

A)



B)

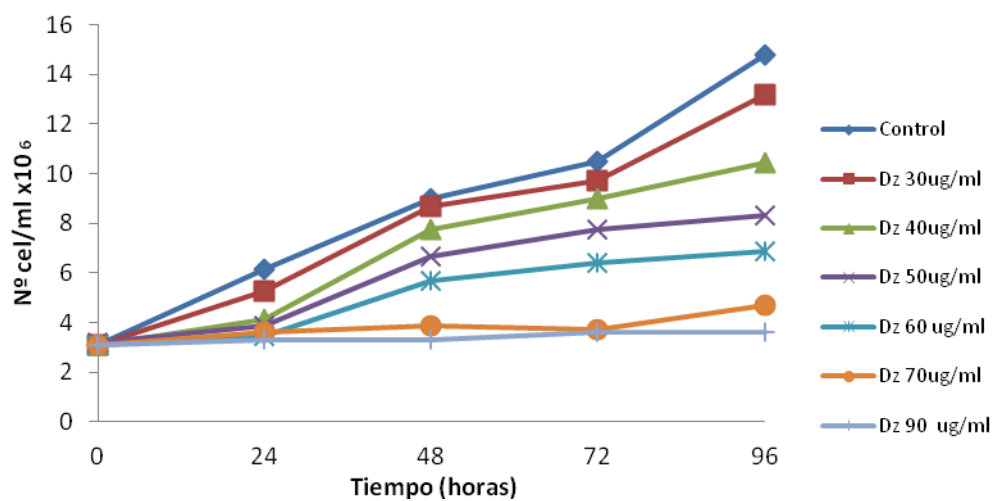
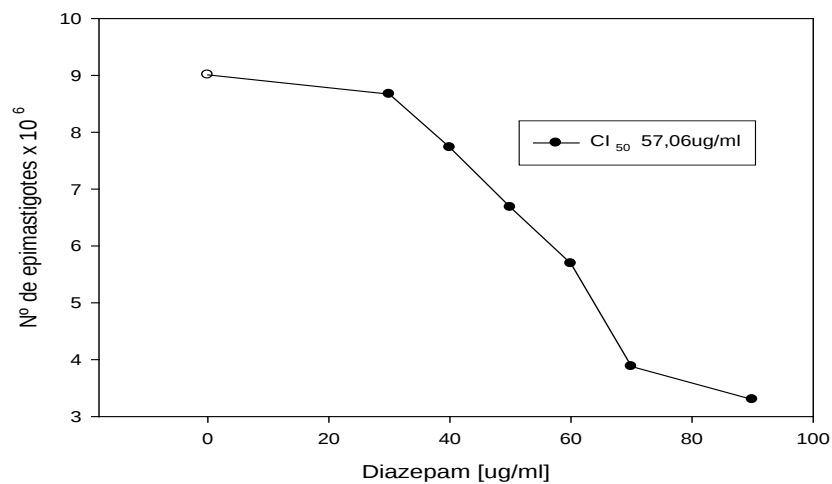


Figura 28. Acción antiproliferativa del Diazepam sobre los epimastigotes de *T. cruzi*. **A.** Cepa Biomed, **B.** Cepa Y.

A)



B)

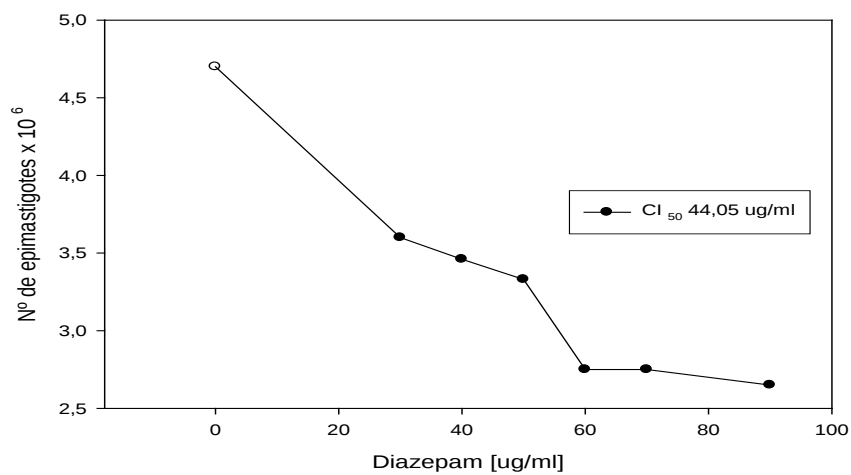


Figura 29. Curva dosis respuesta a las diferentes concentraciones del Diazepam a las 48 horas de incubación. Determinación del CI_{50} mediante el programa Sigmaplot. **A.** Ceba Biomed, **B.** Ceba Y.

5.13 Efecto del Diazepam sobre la morfología de los epimastigotes de *T. cruzi* (Cepa Y).

Observaciones a microscopio de luz permitieron determinar que los epimastigotes sometidos al tratamiento con Diazepam sufrieron muy pocos cambios en su morfología. La forma alargada típica del epimastigote se mantuvo, aunque el cuerpo pareció en general más engrosado (Figura 30), se evidenció la presencia frecuente de epimastigotes con dos flagelos de diferente longitud muy cercanos y / o inicios de separación de células hijas en la parte posterior del cuerpo del epimastigote.

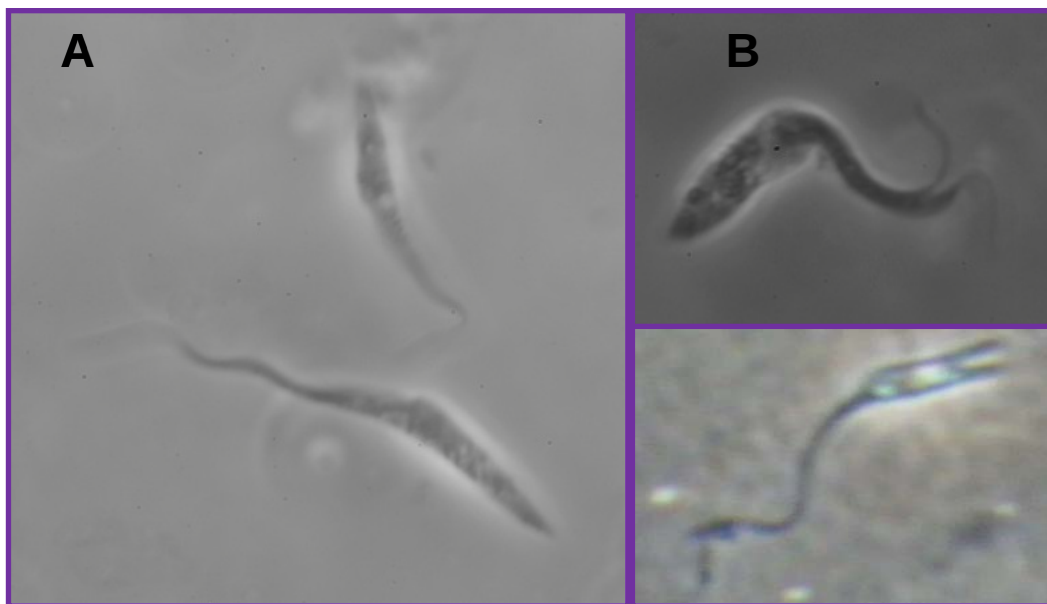


Figura 30. Morfología de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) tratados con Diazepam a una concentración de 45µg/ml a las 48 horas de incubación. **A)** Promastigotes control 400X. **B)** Tratadas con Diazepam a 45µg/ml. 400X

5.14. Citotoxicidad del Diazepam sobre las Células Vero. Determinación del CI_{50}

Se evaluó la actividad citotóxica del Diazepam sobre células Vero, mediante el ensayo con MTT. El valor del CI_{50} obtenido mediante el software GraphPad es de $55,08 \mu\text{g/ml} \pm 1,01$, como se puede observar en la figura 31. Estas células presentaron una sensibilidad mayor que los macrófagos frente a las dosis utilizadas de Diazepam, obteniéndose valores menores al 10% de reducción del MTT hasta los $50 \mu\text{g/ml}$ del tratamiento. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

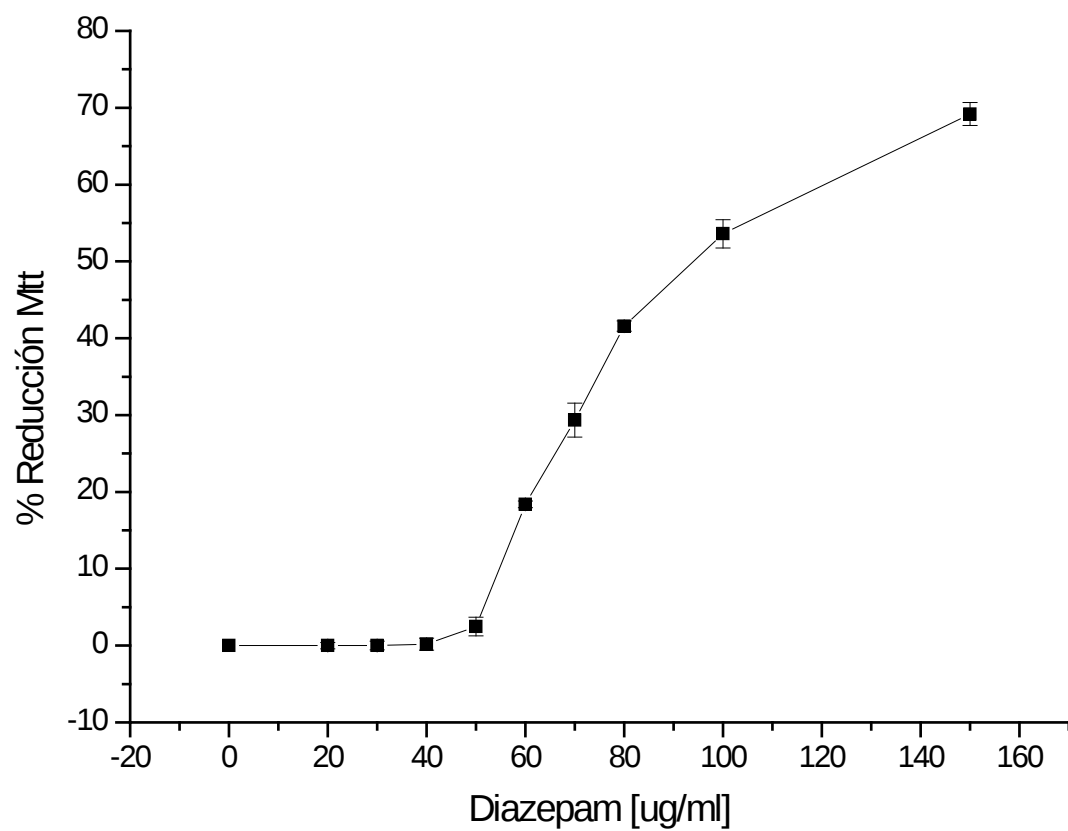


Figura 31. Representación gráfica de la citotoxicidad del Diazepam sobre células Vero a las 48 horas de incubación mediante el MTT.

6. Discusión.

Los resultados obtenidos indican una fuerte acción antiproliferativa del Diazepam, mostrados por la inhibición en el crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana*, obteniéndose una respuesta dosis dependiente. El CI_{50} estimado a través del seguimiento del crecimiento celular por espectrometría a 550nm es de 36,25 $\mu\text{g/ml}$, mientras que el calculado utilizando el ensayo con MTT es de 27,98 $\mu\text{g/ml}$. Estos resultados están en concordancia con estudios previos realizados en el Laboratorio de Biología Celular de Parásitos donde se encontró que esta droga inhibe la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* en forma dosis dependiente y el CI_{50} reportado fue de 20 $\mu\text{g/ml}$ a las 48 horas (Hernández, 1996). Las diferencias entre los valores obtenidos por nosotros y los anteriormente reportados, podemos atribuirlos a diversos factores, entre ellos a la diferente sensibilidad que muestran los parásitos a las drogas dependiendo del número de repiques que tenga el cultivo y otro factor muy importante se lo atribuimos al diferente comportamiento de la droga cuya actividad varía con el proceso de congelamiento y descongelamiento, tiempo de almacenaje y marca del producto. El Diazepam induce cambios morfológicos interesantes en los promastigotes de *Leishmania*, se observan una diversidad de formas que van de elipsoidal a esférica, con la presencia de uno o dos flagelos de diverso tamaño y aún células en forma elipsoidal sin flagelo libre. La presencia de uno o dos flagelos en el mismo sitio anterior del cuerpo del

parásito parece indicar un bloqueo de la división celular en las etapas iniciales, específicamente impidiendo la separación del cuerpo basal. La ausencia en muchas células del flagelo libre es indicativo de una depolimerización de los microtúbulos del flagelo, hecho que es corroborado por los estudios ultraestructurales, donde se observa depolimerización parcial del par central de MTs del axonema del flagelo. Las alteraciones morfológicas se comenzaron a observar a concentraciones mayores de 30 µg/ml después de las 24 horas de tratamiento.

Las observaciones realizadas a nivel ultraestructural muestran que efectivamente el Diazepam bloquea el proceso de duplicación del cuerpo basal y/o la separación de los mismos. Este es uno de los eventos iniciales del ciclo celular en *Leishmania* y en general en tripanosomatideos (Robinson y Gull, 1991). La presencia generalmente de un solo núcleo y un Kinetoplasto en promastigotes de *L. mexicana* tratados con Diazepam, es indicativo que la señal para el avance del ciclo celular quedó bloqueada en un punto anterior, la duplicación del cuerpo basal. Estos resultados concuerdan con los reportados en algas unicelulares donde el Diazepam a concentraciones de 30 – 70 µg/ml, impide la división y la separación del cuerpo basal durante la profase (Marano y col., 1984), donde se encontró que los microtúbulos no parecen estar involucrados en este proceso, pero si probablemente la actina, ya que una proteína semejante a la actina fue localizada en la zona anterior del cuerpo del alga *Dunaliella* y alrededor del cuerpo basal.

La presencia de alteraciones en la matriz mitocondrial así como la ausencia parcial de elementos en la zona de conexión entre el cuerpo basal y la membrana anterior del mitocondrion que limita al Kinetoplasto, donde han sido reportadas la presencia de redes fibrilares (Souto y col., 1984), evidenciado también por el desplazamiento relativo del mitocondrion con respecto al cuerpo basal, indican que posiblemente el Diazepam esté actuando a nivel de esas estructuras. Estos hallazgos nos hacen sugerir que el sitio primario de la acción del Diazepam podría ser el cuerpo basal o elementos proteicos fibrilares asociados. El cuerpo basal actúa como un centro organizador de los microtúbulos componentes del flagelo, (MTOC) así que su alteración podría conducir al deterioro de la ultraestructura flagelar. Varios reportes parecen indicar que el Diazepam actúa en forma directa o indirecta sobre elementos del citoesqueleto. Así el Diazepam inhibe la dispersión de fibroblastos de embrión de pollo (Nagele y col., 1983) por disminución y desorganización de la actina. En otros sistemas el Diazepam induce reducción en el contenido de la miosina por célula e inhibición de su síntesis (Walker y col., 1979).

Los cambios observados en la ultraestructura del mitocondrion, matriz alterada con presencia de estructuras reticulares y vesículas membranosas de gran tamaño, nos condujeron a realizar un ensayo con Rodamina 123, no encontrando alteraciones del potencial transmembrana mitocondrial. El Diazepam a concentraciones de 70-150 µg/ml inhibe significativamente el

consumo de oxígeno en las células de riñón de embrión de cochino y disminuye el nivel de ATP celular, pero preserva el potencial de membrana de la mitocondria (Vorobjev y Zorov, 1983). Este resultado reportado concuerda con los obtenidos por nosotros a concentraciones mucho más bajas.

Los resultados encontrados en cuanto a la disminución de la infección en los macrófagos J774 en un 35% a una concentración de Diazepam de 45 $\mu\text{g/ml}$, valor un poco superior al CI_{50} encontrado para los promastigotes y de un 41% a una concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$, ambas concentraciones muy por debajo del CI_{50} calculados para los macrófagos, son comparables con otras drogas probadas experimentalmente entre ellas el herbicida Triflurarín, considerada en su momento con gran potencial como una droga contra la Leishmaniasis, (Chan y Fong, 1990), al reportar una reducción del porcentaje de infección de un 50% comparado con el control. Estos resultados conjuntamente con los obtenidos sobre el proceso de infección, de una disminución hasta un 15%, de la capacidad de infección de los macrófagos a concentraciones de la droga de 90 $\mu\text{g/ml}$ y siendo el Diazepam una droga utilizada frecuentemente en humanos, despierta nuestro interés en realizar ensayos experimentales en el sistema murino.

Los resultados obtenidos sobre los epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Biomed y cepa Y, debemos considerarlos muy preliminares. Las dificultades que enfrentamos para mantener y reproducir en óptimas condiciones en el

laboratorio un aislado proveniente de un caso reciente de infección y la pérdida de la cepa Y por contaminación a los pocas semanas de mantenerla, aunado a dificultades para su reposición por parte de los laboratorios que la suministraron, hizo difícil montar el número de experimentos necesarios para lograr resultados consistentes. Sin embargo creemos que algunos de los resultados son interesantes, como la sensibilidad de las células Vero al Diazepam, con un CI_{50} de 55 $\mu\text{g/ml}$, muy cercano al CI_{50} obtenido para la cepa Biomed y cepa Y, nos hace descartar a estas células para experimentos de infección con esta droga, también los epimastigotes de *T. cruzi* parecen ser menos sensibles al Diazepam que los promastigotes de *Leishmania*.

7. Conclusiones

- ❖ El Diazepam inhibe la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* de manera dosis dependiente de la concentración. El CI_{50} obtenido está en un rango entre 27, 98 $\mu\text{g/ml}$ y 36, 25 $\mu\text{g/ml}$.
- ❖ El Diazepam induce cambios en la morfología del parásito bloqueando el ciclo celular en su etapa inicial, a nivel de la duplicación y separación del cuerpo basal.
- ❖ Encontramos evidencias a nivel ultraestructural y antecedentes en otros tipos celulares de una posible acción del Diazepam sobre elementos del citoesqueleto, ubicados alrededor del cuerpo basal de las células.
- ❖ Son evidentes la presencia de alteraciones en las crestas internas del mitocondrion, sin cambios en el potencial transmembrana.
- ❖ El Diazepam hace más lento o incompleto el proceso de diferenciación de la forma promastigote a amastigote, bajo choque térmico, quedando una alta proporción de células elipsoidales, y bloquea totalmente el proceso de reversión a la forma promastigote a 27 °C.
- ❖ La baja citotoxicidad del Diazepam, sobre la línea de macrófagos J774, así como la disminución del porcentaje de infección en un 35%, nos estimula a realizar ensayos en el sistema murino.

- ❖ Los resultados con epimastigotes de *T. cruzi*, cepas Biomed y cepa Y son preliminares, debido al bajo crecimiento y dificultades de adaptación de los cultivos.

- ❖ Las células Vero generalmente utilizadas para estudios de infección con tripanosomas, resultó sensible al Diazepam, con un CI_{50} de 55 $\mu\text{g/ml}$, bastante cercano al CI_{50} obtenido para los epimastigotes de *T. cruzi*.

8. Bibliografía

- 1) Anderson, L.; Lehto, V. P.; Stenman, S.; Badley, R. A.; Virtanen, I. 1981. Diazepam induces mitotic arrest at prometaphase by inhibiting centriolar separation. *Nature*. 291: 247- 248.
- 2) Bard, E. 1989. Molecular biology of *Leishmania*. *Biochem. Cell Biol.* 67: 516-524.
- 3) Barreto, M. P. 1979. Epidemiología. En: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas.
- 4) Belford, E. y Botto, C. 2000. Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Programa de Enseñanza 2000-2001 del Instituto de Medicina Tropical. 82-87.
- 5) Bonfante-Garrido, R. y Barroeta, S. 2002. Leishmaniasis y *Leishmanias* en América, con especial referencia a Venezuela.
- 6) Carlier, Yves. 2003. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). *Medicine*: 1-24.
- 7) Chan, M. M. y Fong, D. 1990. Inhibition of *Leishmanias* but not host macrophages by antitubulin herbicide Trifluralin. *Science*: 249:924-926.

- 8) Clarke, K. D. y Ryan, P. J. 1980. Tranquillizers can block mitogenesis in 3T3 cells and induces differentiation in Friend cells. *Nature*.287: 160-161.
- 9) Convit, J and Pinardi, M.E. 1972. Difuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an inmunological defect to the host. *Trans.Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66: 603-610.
- 10) Convit, J. and Pinardi, M.E. 1974. Cutaneous leishmaniasis. The clinical and inmunological spectrum in South America. In: *Trypanosomiasis and Leishmaniasis whith special reference to Chagas`s disease*. Ciba Foundation Symposiun nº 20 (new series). Amsterdam, Elsevier/Excerpta Medica/North-Holland, pp. 159-169.
- 11) Faraut-Gambarelli, F., Piarruox, R., Deniau, M.; Gustabo, B.; Marty, P.; Michel, G.; Faugere, B. y Dumon, H. 1997. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 31 strains collected from patients whith visceral Leishmaniasis *Antimicrob. Agents. Chemother.* 41:827-830.
- 12) Hernández, Concepción. 1996. El citoesqueleto de *Leishmania* y su susceptibilidad a drogas antimicrotúbulos. Tesis Doctoral. Departamento de Biología Celular, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UCV. Caracas - Venezuela.

- 13) Herrera, L y Urdaneta-Morales, S. 2001. Experimental transmission of *Trypanosoma cruzi* through the genitalia of albino mice. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96: 713-717.
- 14) Hoare, C. 1972. The *Trypanosome* of Mammals. Blackwell. SC. Pub. Oxford.
- 15) Johnson, L. V.; Walsh, M. L. y Chen, L. B. 1980. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. Cell Biol. 77, 990-994.
- 16) Johnson, L. V.; Walsh, M. L.; Bockus, B. J. y BO Chen, L. 1981. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. J. Cell. Biol. 88, 526- 535.
- 17) Lainson, R.; Shaw, J. J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution: In: Killick-Kendrick, R .The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London: Academic Press, 1-120.
- 18) Lenzi, H.; Oliveira, D. N.; Lima, M. T. y Gattass, C.R. 1996. *Trypanosoma cruzi*: Paninfectivity of CL Strain during Murine acute Infection. Exp. parasitology. 84: 16-27.
- 19) Lenzi, H.; Castelo-Branco, M. T. L.; Pelajo-Machado, M.; Oliveira, D. N. y Gattass, C.R. 1998. *Trypanosoma cruzi*: compromise of reproductive system in acute murine infection. Acta Tropica. 71:117-129.

- 20) Levitan, I. y Laezmarek, L. 2002. The Neuron Cell and Molecular Biology. 3rd Edition. Oxford. pp. 264-275.
- 21) Marano, F.; Santa-Maria, A. y Fries, W. 1984. Effects of Diazepam on mitosis and basal body duplication of synchronously dividing flagellate cells. Biol. Cell. 50: 163-177.
- 22) Mendoza- León, A. 1996. A guide for the cutaneous Leishmaniasis connoisseur. Capeter 1.R.G. Landes Company.
- 23) Molyneux, D. H. 1987. Morphology, ultrastructure and life cycle. In: Killick-Kendrick, R .The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London: Academic Press, 121-176.
- 24) Mosman, T. 1983. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 65: 55-63.
- 25) Nagele, R. G.; Pietrolungo, M.; Kosciuk, M.C.; Lee, H. y Roisen, F.J. 1983. Diazepam inhibits the spreading of chick embryo fibroblast. Exp. Cell Res.143: 153-162.
- 26) Oullette, M.; Orummelsmith, J. y Papadopoulou, B. 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. Drug Resist. Updat. 7: 257-266.

- 27) Pifano, F. 1973. Algunos aspectos de la ecología y epidemiología de las enfermedades endémicas con focos naturales en el área tropical, especialmente en Venezuela. Arch. Venez. Med. Trop. Parasit. Med. V: 225-272.
- 28) Ponte-Sucre, A. 2003. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for Chemotherapy. Kinetoplastid biology and disease. 2: 1-10.
- 29) Ramírez, J.L. y Guevara P. 1987. The ribosomal gene spacer as a tool for the taxonomy of *Leishmania*. Mol. Bio. Parasitol. 22:177-183.
- 30) Robinson, D. y Gull, K. 1991. Basal body movement as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. Nature 352: 731-732.
- 31) Rodríguez, N.; Cardona, M.; Zerpa, O.; Barrios, M.; Sosa, A. y Fernández, A. 2001. Aplicación de herramientas moleculares en el diagnóstico y caracterización de *Leishmania spp.* en áreas endémicas de Venezuela. Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental. Vol. XLI, Nº 1 y 2, 21 -26.
- 32) Rondón, A. J. 1993. Leishmaniasis Tegumentaria Americana Clínica Dermatol. Venez. 31: 12-17.

- 33) Schofield, C. J. y Dias, J. C. P. 1995. Introduction and historical overviews. En: International Workshop on populations' genetics and control of triatomine. Santo Domingo Colorado. Ecuador. 24-28 September, 1995; pp. 11-16.
- 34) Skulachev, V. P. 1988. Membrane bioenergetics. Springer – Verlag, Berlin.
- 35) Souto, P.T.; De Souza W. y Heuser J.E. 1984. Quick freeze, deep etch rotary replication of *T. cruzi*. and *Herpetomonas megaseliae* J. Cell Biol. 69: 167-178
- 36) Tyler, K. M. y Engman, D.M. 2001. The cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int. J. Parasitol. 31: 472- 481.
- 37) Vázquez, L.; Sierra, D. y Rojas, E. 2002. Mecanismos de transmisión de la Leishmaniasis. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 22 (2): 1-14.
- 38) Vorobjev, I. A. y Zorov, D.B.1983. Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum. FEBS LETTERS. 163:311-314.
- 39) Walker, C. R.; Bandman, E. y Strohman R.C. 1979. Diazepam induces relaxation of chick embryo muscle fibers in vitro and inhibits myosin synthesis. Experimental Cell Res. 123: 285-291.

- 40) Zerpa, O.; Ulrich, M.; Benítez, M.; Ávila, C.; Rodríguez V.; Centeno, M.; Bellizario, D.; Reed, S.G. y Convit, J. 2002. Epidemiological and immunological aspect of human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. Men Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 97: 1079-1083.

Referencias electrónicas.

- 41)http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Para_Health.htm. [Consulta: 04 de Marzo del 2010].
- 42)<http://www.medicina.ufm.edu/cms/es/Enfermedad-de-Chagas>. [Consulta: 04 de Marzo del 2010].
- 43)<http://www.who.int/infectious.Disease-report/2000>[Consulta: 04 de Marzo del 2010].