

DISEÑO, SINTESIS Y SCREENING FARMACOLOGICO Y TOXICOLOGICO DE DROGAS ANTICHAGASICAS SOBRE UN MODELO DE CHAGAS EXPERIMENTAL EN RATON

**Jorge Miño,
Daniel Grana,
María Teresa Pizzorno
y Kumiko Eiguchi**

1. Introducción

Dos de las drogas efectivas en la fase aguda de la enfermedad de Chagas, Nifurtimox y Benznidazol, tienen importantes efectos adversos -principalmente a nivel del Sistema Nervioso Central y Periférico- que restringen su uso.

De hecho, una de ellas ya fue retirada del comercio. Por ello la necesidad de investigación en la búsqueda de compuestos menos nocivos.

El objetivo del trabajo es la evaluación de la actividad tripanomicida de series de 5,6-dihidrobenzo-[a]-carbazoles disustituídos en un modelo de Chagas experimental en ratón. Paralelamente y dentro del contexto general comprendido en la Toxicología Preclínica en el desarrollo de drogas se evaluará el perfil toxicológico a través de distintos procedimientos experimentales en la búsqueda de compuestos efectivos y con efectos colaterales mínimos o mejor aún ausentes, para un control eficaz y seguro de la enfermedad de Chagas en sus fases aguda y crónica en el humano.

2. Metodología

Se utilizan ratones Swiss de 5 semanas de edad inoculados i.p. con 105 formas sanguíneas de *T.cruzi* cepa Tulahuén (Día 0). A partir de esta etapa, dividimos a los animales en tres grupos: El grupo Control Negativo recibe vehículo del día 3 al 7 postinfección. El grupo Control Positivo recibe Nifurtimox (Lampit-Bayer) desde el día 3 hasta el día 7 postinfección. El Grupo Tratado recibe las diferentes drogas (dosis 100 mg/kg, i.p.) desde el día 3 al 7 postinfección. El desarrollo experimental corresponde al método de Kinnamon y Steck modificado (Fig.1). Se analizaron 18 miembros de una serie de 5,6-dihidrobenzo-[a]-carbazoles (Fig.2).

La eficacia terapéutica post-tratamiento se evalúa por:

a. Determinación de la parasitemia (Número de parásitos en 25 campos de 400X) al día 10 post-tratamiento. Corresponde al método de Brener modificado. Análisis estadístico por ANOVA.

- b. Evaluación de la sobrevida al día 15. Análisis estadístico de los resultados: test del CHI².
- c. Estudio de parámetros bioquímicos (Glucosa, urea, bilirrubina, GOT, GPT; todos ellos métodos enzimáticos de Boehringer): su posible modificación por los tratamientos.
- d. Perfil psiconeuroautonómico (test de Irwin) en los animales tratados para detectar posibles efectos adversos de las diferentes drogas sobre el comportamiento. El desarrollo experimental se detalla en la Fig. 12.
- e. Test de Ames para la detección de posibles efectos mutagénicos de las drogas. El desarrollo experimental se muestra en la Fig. 17.
- f. Ensayo de quimioluminiscencia, para detectar la formación de radicales libres. El desarrollo experimental se detalla en la fig. 15.

3. Resultados

a. *Determinación de la parasitemia* (Fig. 3, 4 y 5)

La parasitemia ($x \pm SE$) contada en 25 campos de 400x fue de 87 ± 6 parásitos (Control negativo = grupo infectado) y de 17 ± 2 parásitos (Control positivo = Nifurtimox).

La diferencia entre ambos grupos es significativa ($p < .001$ -ANOVA). Nueve de las 18 drogas estudiadas (II, III, IV, VII, VIII, X, XII y XIV) disminuyen la parasitemia en un valor no significativamente diferente (ANOVA) del alcanzado por el Control Positivo (Fig. 3).

De las 9 drogas restantes, 6 (I, IX, XI, XIII, XV y XVI) difieren significativamente del Control Positivo ($p < .05$ -ANOVA) y del Control Negativo ($p < .05$ -ANOVA).

Son menos activas que el Nifurtimox.

Las 3 restantes (V, XVII y XVIII) difieren significativamente del Control Positivo y no tienen diferencias significativas con el Control Negativo. No son efectivas en disminuir la parasitemia (Fig. 4).

Las comparaciones entre grupos se muestran en la Fig. 5. En los márgenes están ordenados los compuestos (del mayor al menor efecto sobre la parasitemia o sea de la menor a la mayor efectividad). Mayormente no hay diferencias entre grupos. Sí se presentan cuando uno de los integrantes no difiere significativamente del Control Negativo o difiere significativamente del Control Positivo o de ambos. Con respecto a la disminución de la parasitemia Control, vemos que 15 compuestos la disminuyen significativamente con $p < .001$ y uno con $p < .05$.

b. *Evaluación de la sobrevida*

De los 18 compuestos estudiados, 14 sobreviven al día 15 de la infección, incluyendo al grupo Control Positivo. En el grupo Control Negativo, los animales mueren al día 10 de la infección (Fig. 6 y 7).

c. Estudio de posibles efectos de los compuestos sobre parámetros bioquímicos

Las determinaciones se llevan a cabo al día 0 y al día 5 del tratamiento.

Ninguno de los parámetros analizados se modificó a lo largo de la experiencia (Fig. 8, 9, 10, y 11).

d. Perfil psiconeuroautonómico

Los resultados se observan en las Fig. 13 y 14. Ningún parámetro de comportamiento de los estudiados sufrió cambio alguno a lo largo del tratamiento.

e. Ensayo de quimioluminiscencia

En ninguno de los grupos estudiados hay diferencias significativas con el grupo control. No hay diferencias significativas entre grupos. (ANOVA). (Fig. 16).

f. Test de AMES para la detección de posibles efectos mutagénicos de las drogas en estudio.

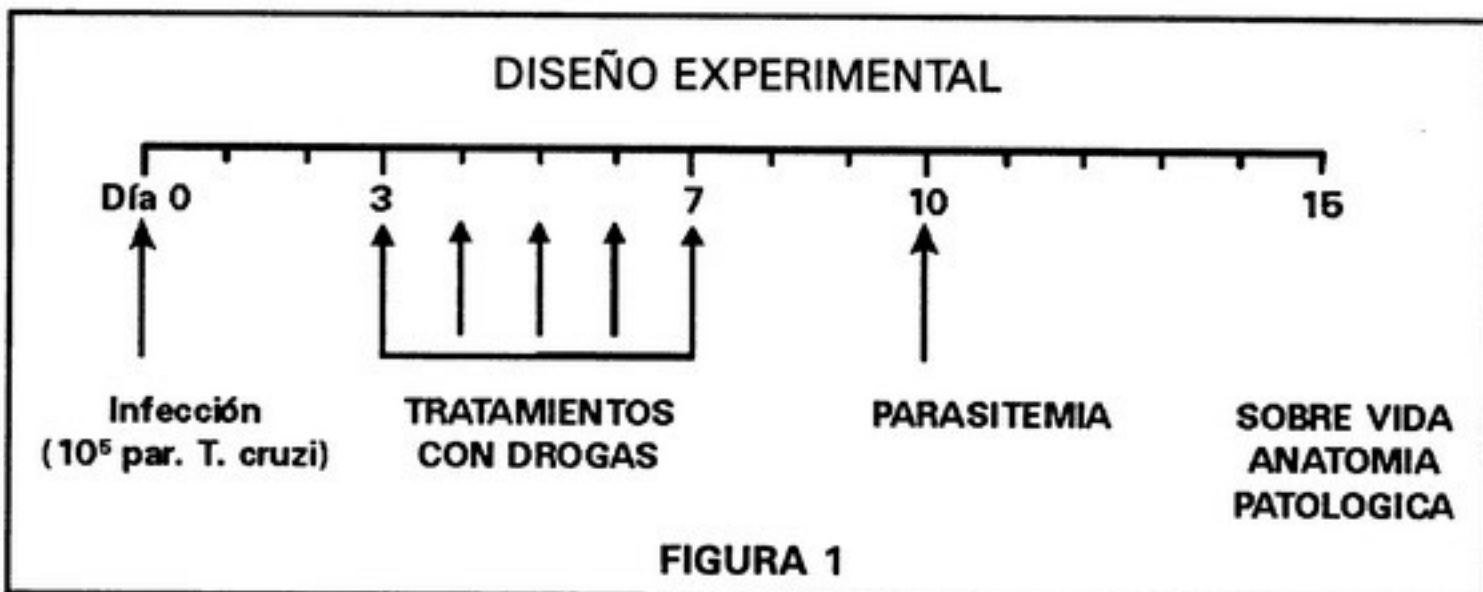
Con el aumento de la concentración (ug/placa) de 6 compuestos se llega a un efecto tóxico (inhibición del crecimiento) pero en ningún caso se detecta efecto mutagénico. Estos resultados están expresados en la Fig. 18.

4. Conclusiones

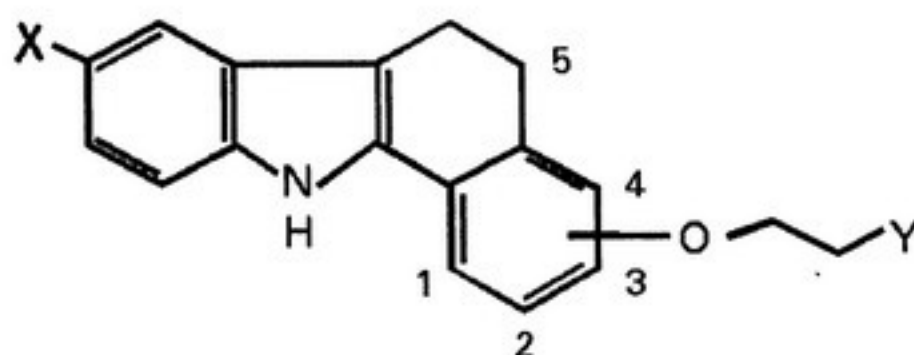
9 compuestos de una serie de 5,6-dihidrobenczo-[a]-carbazoles disustituídos tienen una actividad farmacológica similar al Nifurtimox en el modelo de Chagas agudo experimental en ratón.

Esto sumado a la carencia de efectos tóxicos de estas drogas demostrado en diferentes tests de ensayo preclínico, las hace sumamente aptas para probar su potencial terapéutico en ensayos clínicos en pacientes afectados de enfermedad de Chagas.

En estudios próximos se evaluará su efectividad en modelos experimentales de Chagas crónico.



SERIE DE 5,6 - DIHIDROBENZO - [a]
CARBAZOLES DISUSTITUIDOS
ENSAYADOS COMO ANTICHAGASICOS



COMPUESTO	X	Y	SOLV. RECRIST.	RTO. %	PF C°
I	C1	2-DMA	Etanol	60	105-108
II	CH3O	2-DMA	Etanol	67	213-215
III	C1	2-Morfolino	Etanol	89	220-223
IV	CH3O	2-Morfolino	Etanol	76	128-130
V	C1	2-Piperidino	Etanol	89	214-216
VI	CH3O	2-Piperidino	Etanol/Eter P.	67	203-206
VII	CH3O	3-DMA	Etanol	56	240-243
VIII	C1	3-Morfolino	Metanol/Ac. Et.	81	221-223
IX	CH3O	3-Morfolino	Agua	87	224-226
X	C1	3-Piperidino	Metanol	61	232-235
XI	CH3O	3-Piperidino	Metanol	54	265-268
XII	C1	4-Piperidino	Etanol	53	236-239
XIII	CH3O	4-Piperidino	Etanol/Ac. Et.	70	231-232
XIV	CH3O	4-Morfolino	Agua	63	205-208
XV	C1	4-Morfolino	DMF-Agua	88	237-238
XVI	C1	4-DMA	Agua	72	255-257
XVII	C1	4-DMA	Etanol	79	260-263
XVIII	CH3O	4-DMA	Etanol	73	215-218

FIGURA 2

SCREENING DE NUEVAS DROGAS ANTI-T. CRUZI
Ratón infectado con T. cruzi (Cepa Tulahuen 10^5 parásitos)

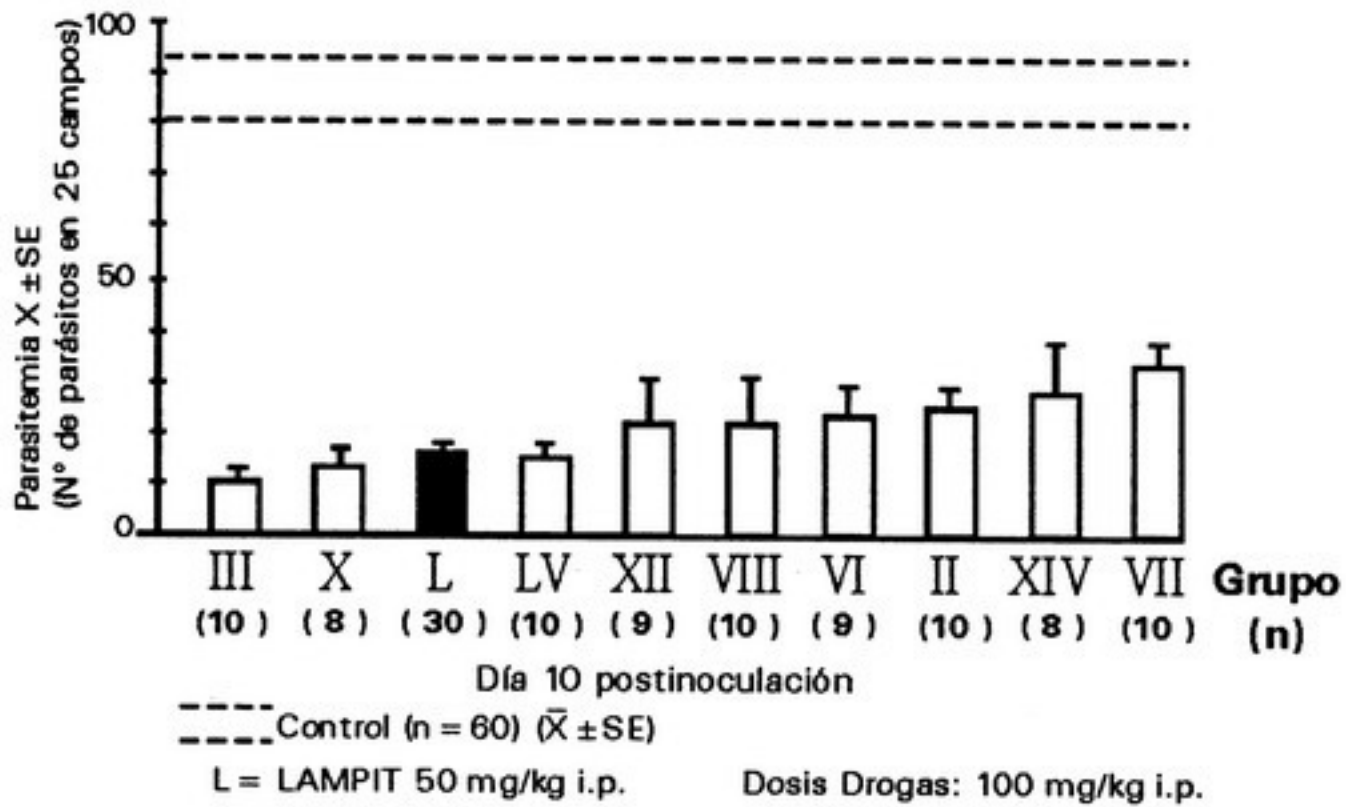


FIGURA 3

SCREENING DE NUEVAS DROGAS ANTI-T. CRUZI
Ratón infectado con T. cruzi (Cepa Tulahuen 10^5 parásitos)

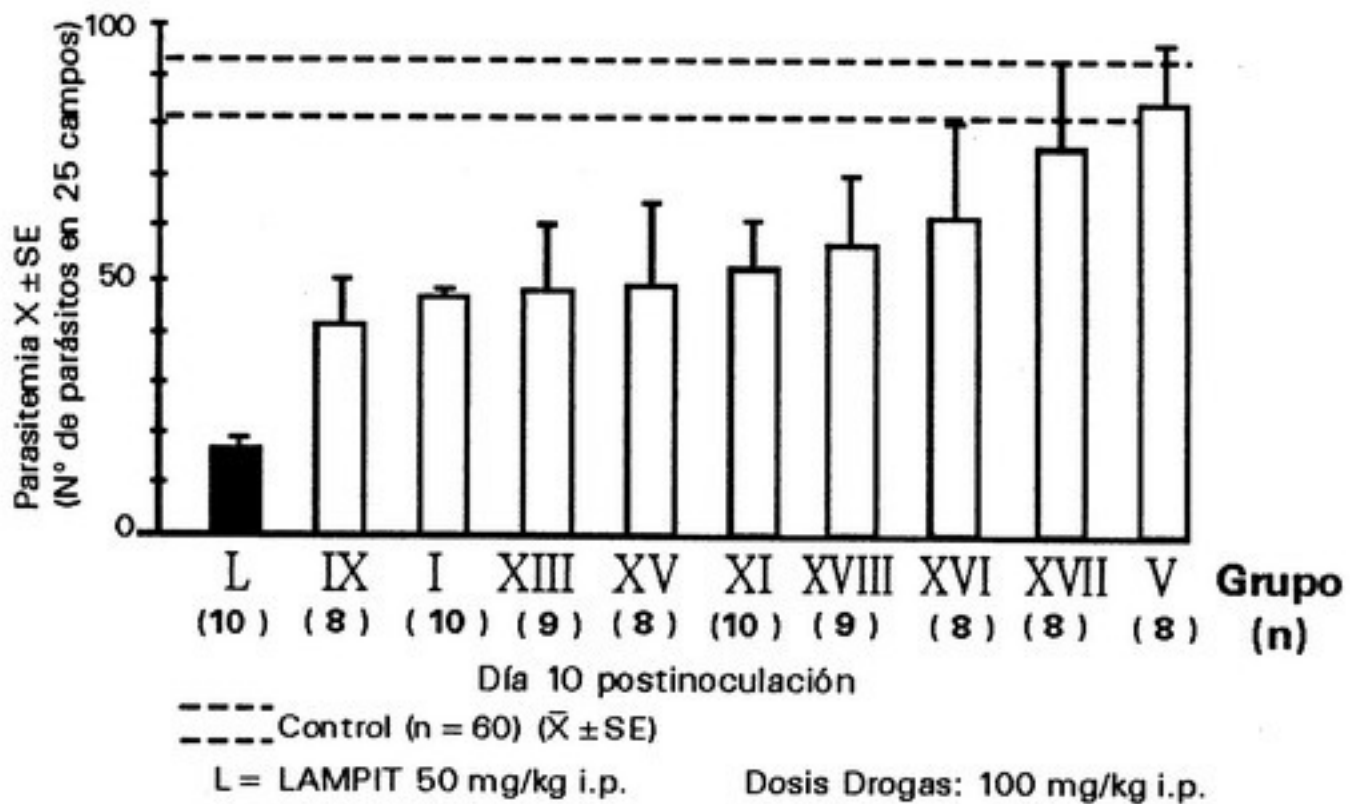
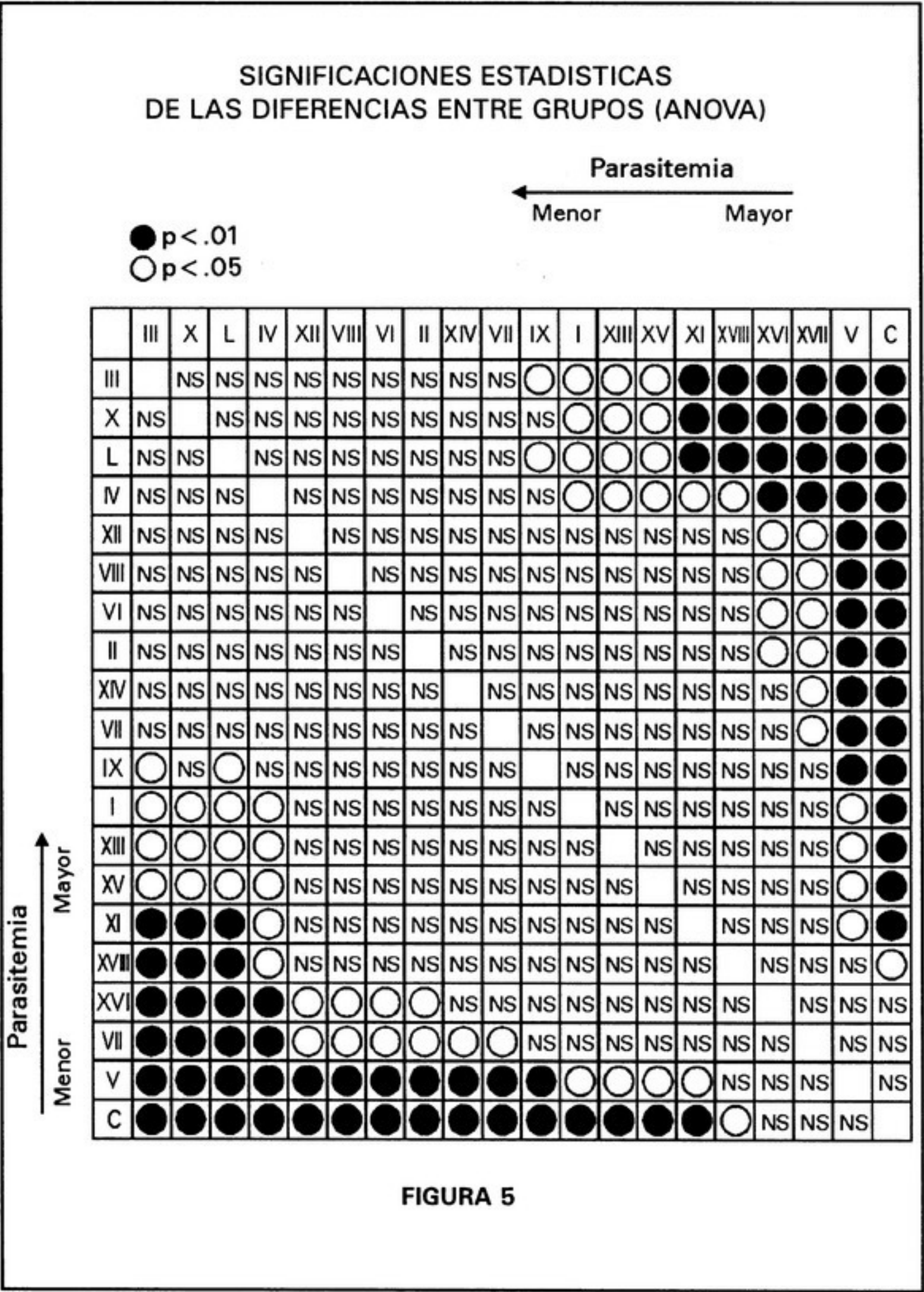
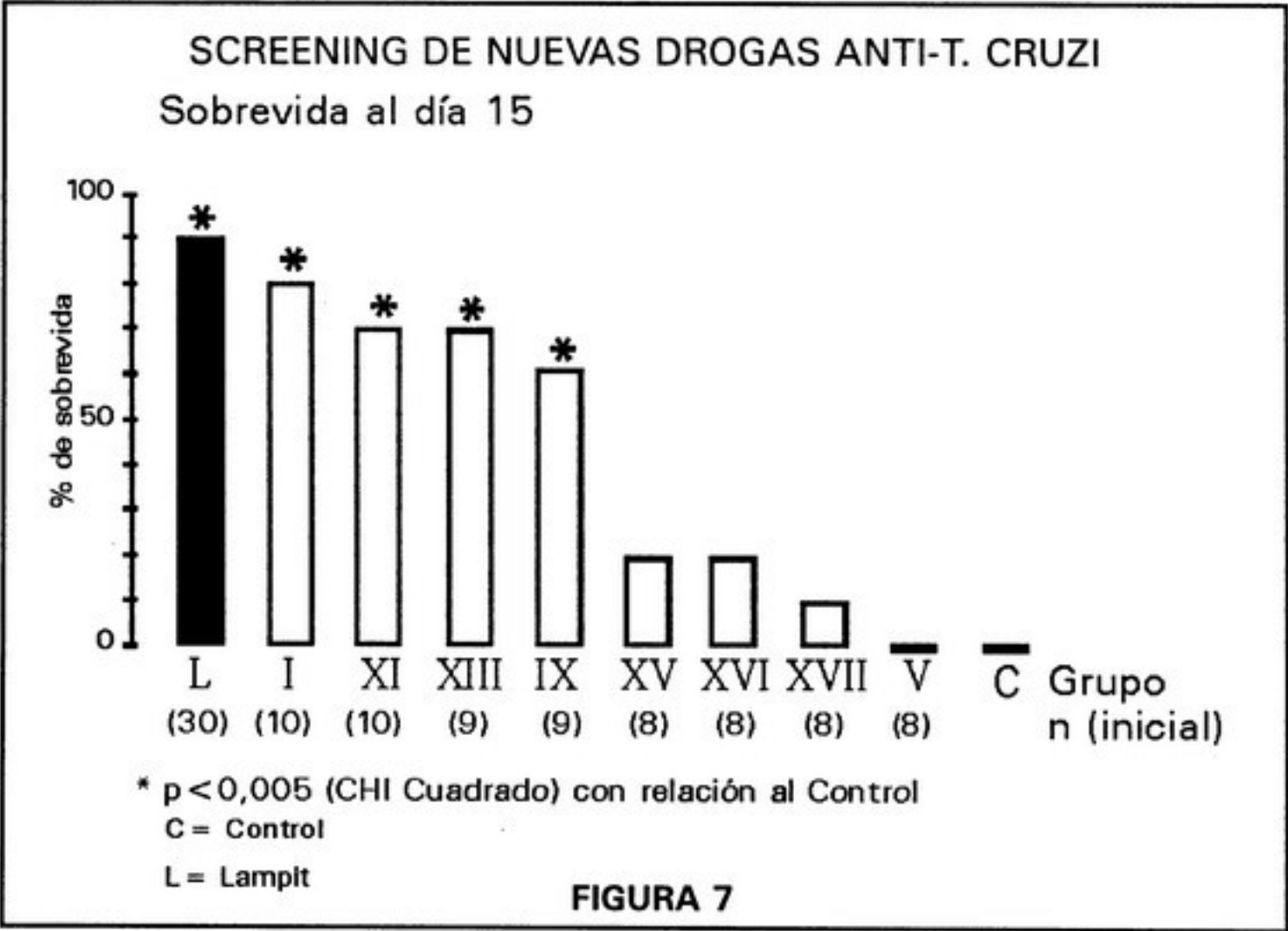
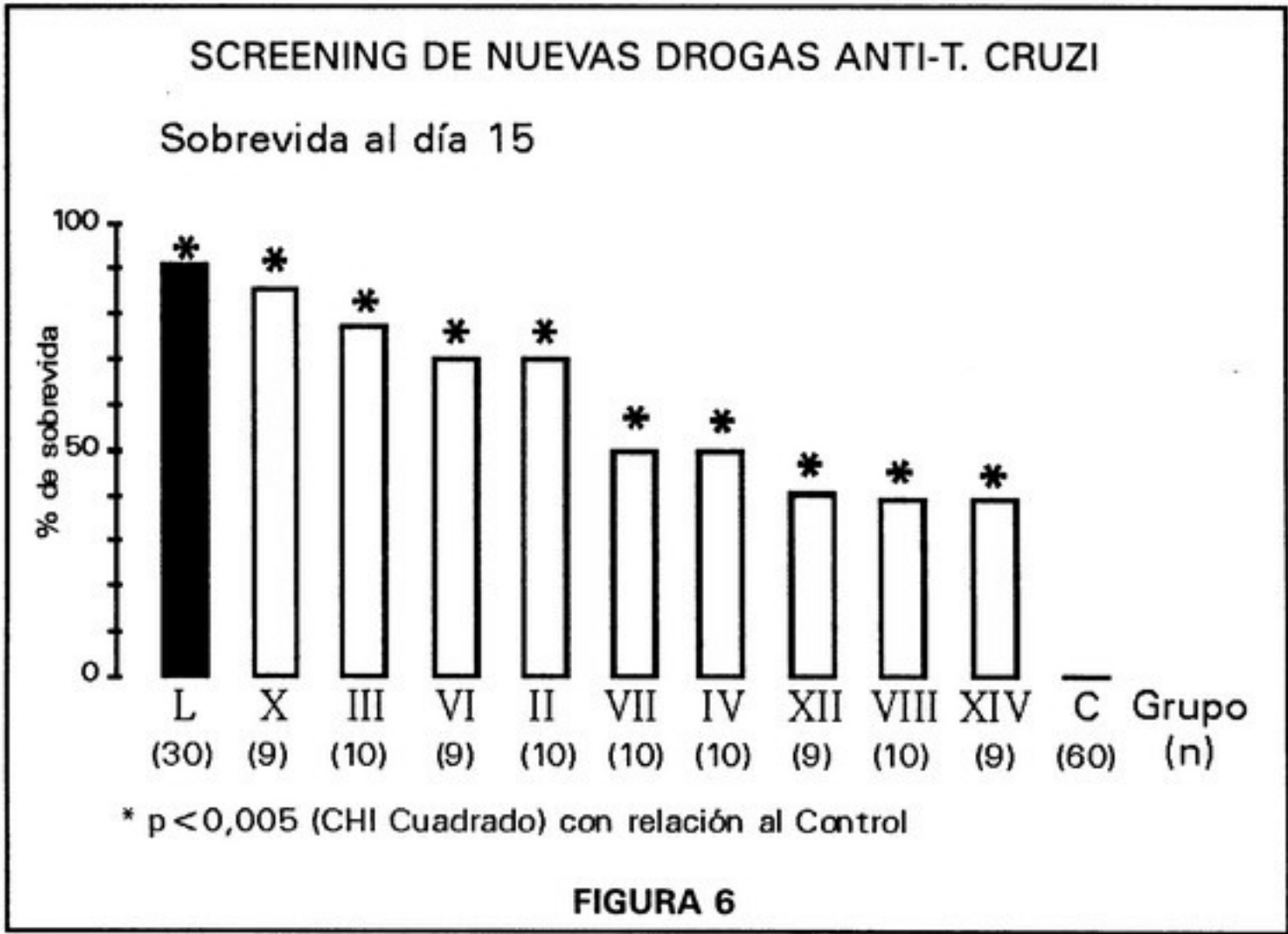
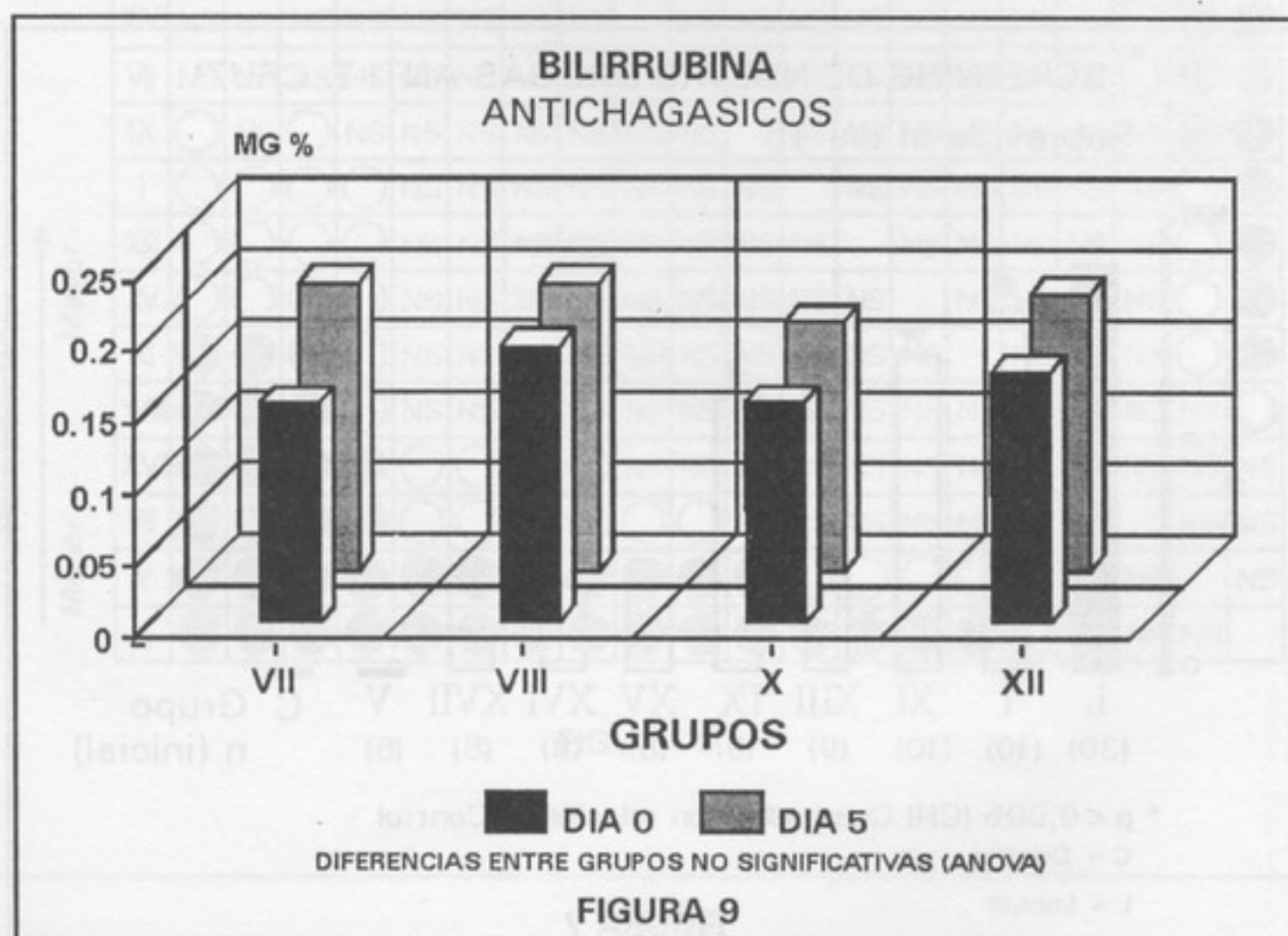
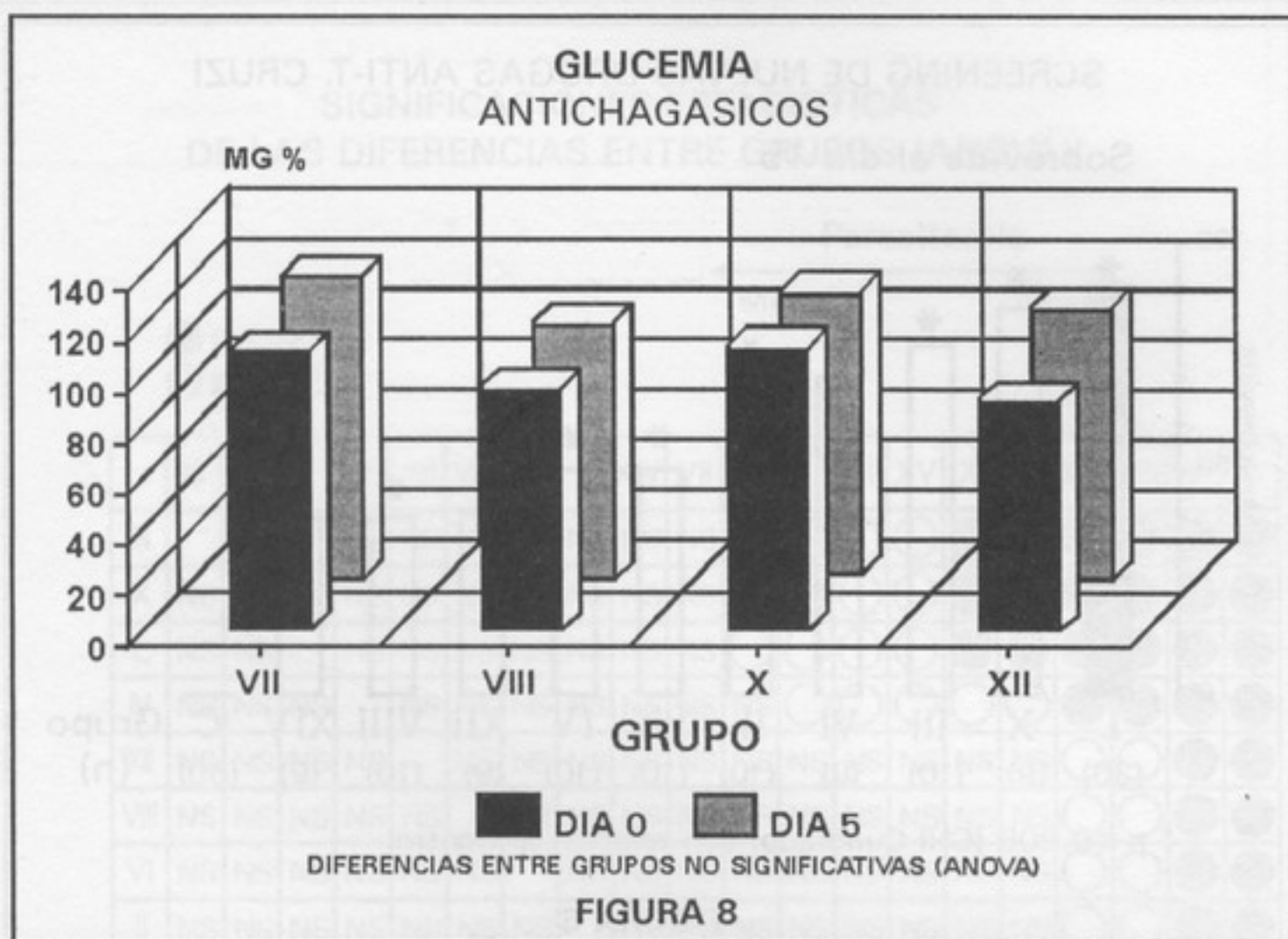
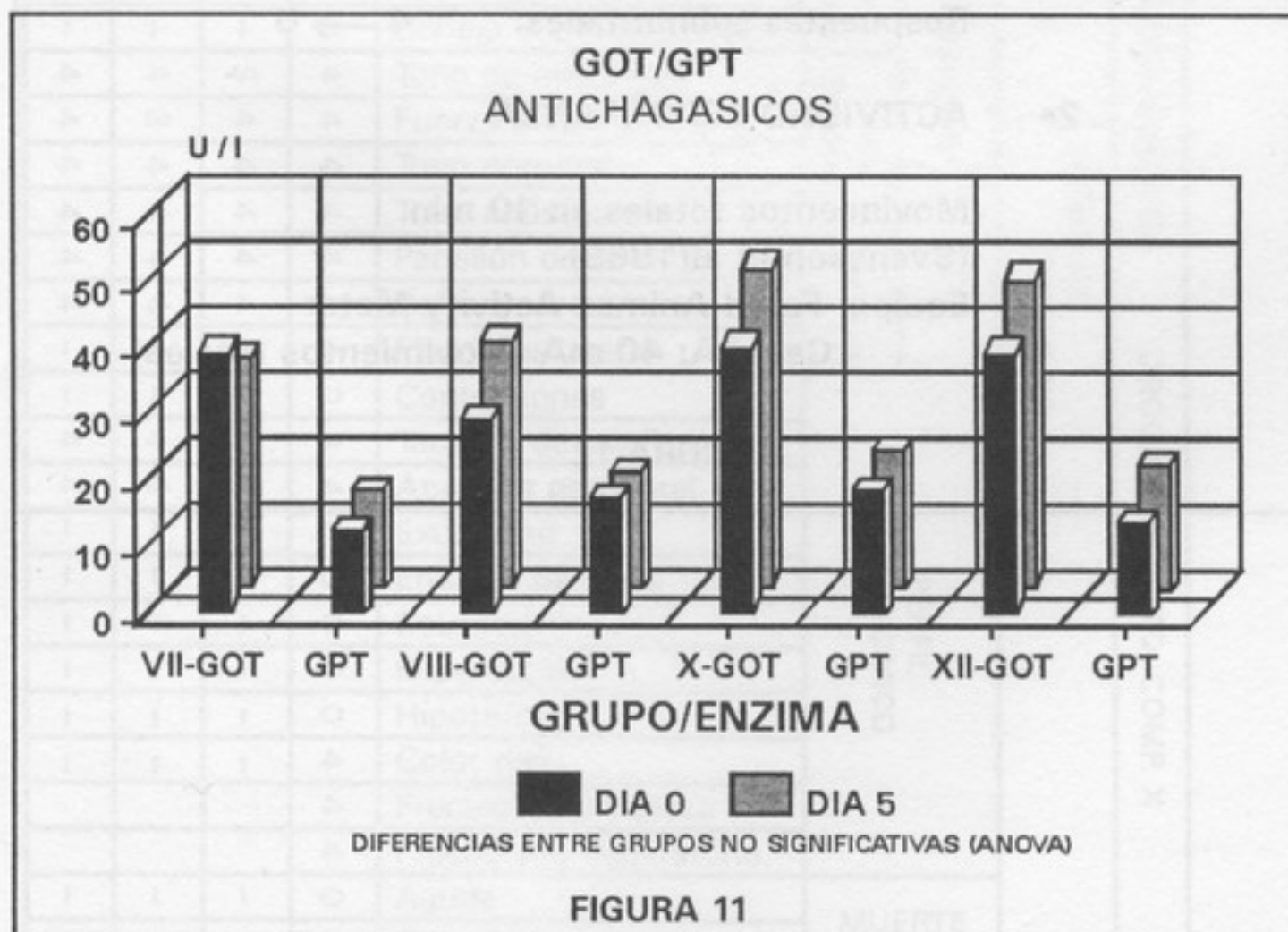
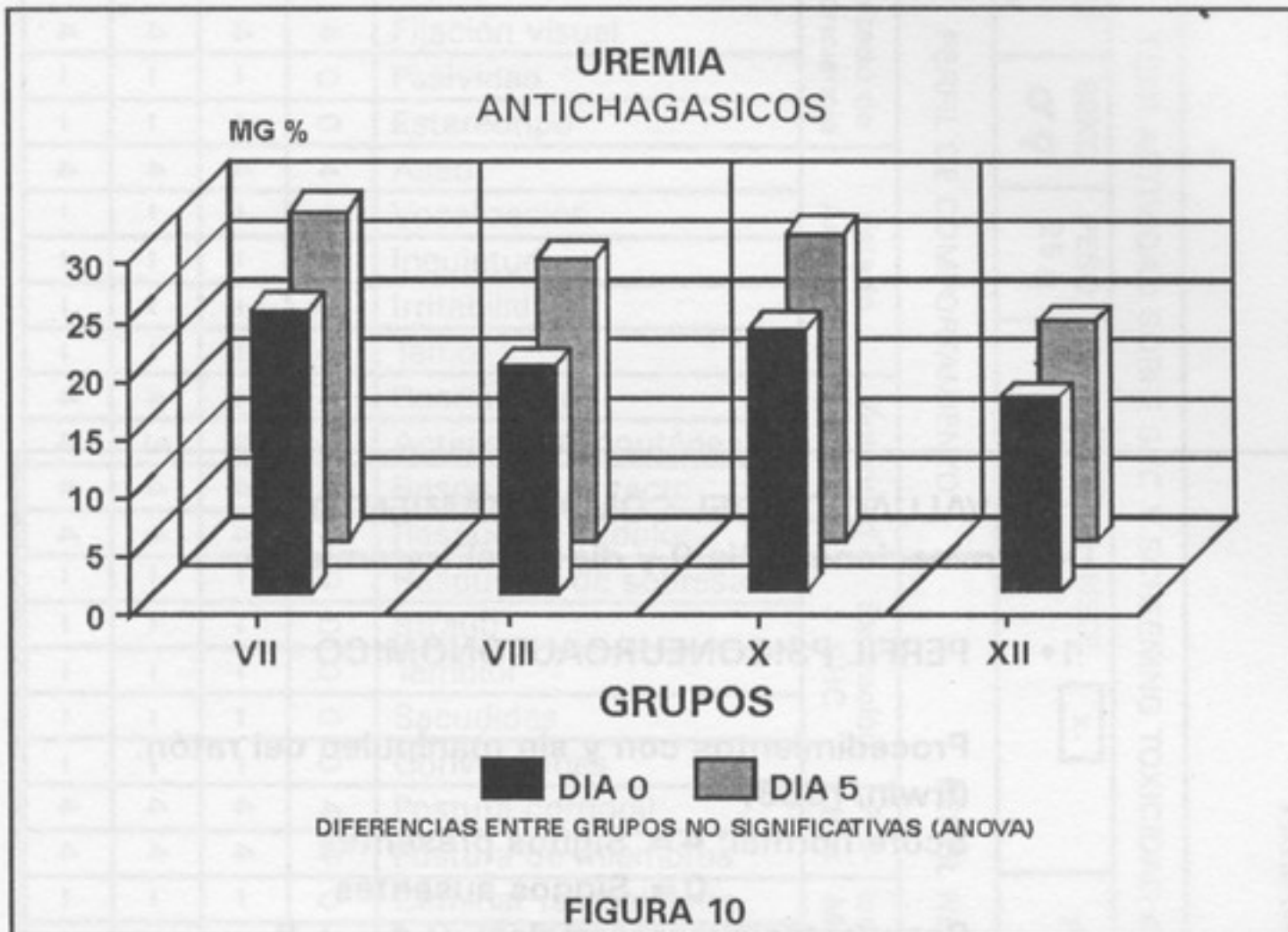


FIGURA 4









EVALUACION DEL COMPORTAMIENTO
Determinaciones: Día 0 y día 5 del tratamiento.

1• PERFIL PSICONEUROAUTONOMICO

Procedimientos con y sin manipuleo del ratón.
(Irwin/1968)

Score normal: 4 = Signos presentes
0 = Signos ausentes

Respuestas supernormales: 0-4 → 8

Respuestas subnormales: 4 → 0

2• ACTIVIDAD ESPONTANEA

Movimientos totales en 10 min.
(Svensson et al/1969)

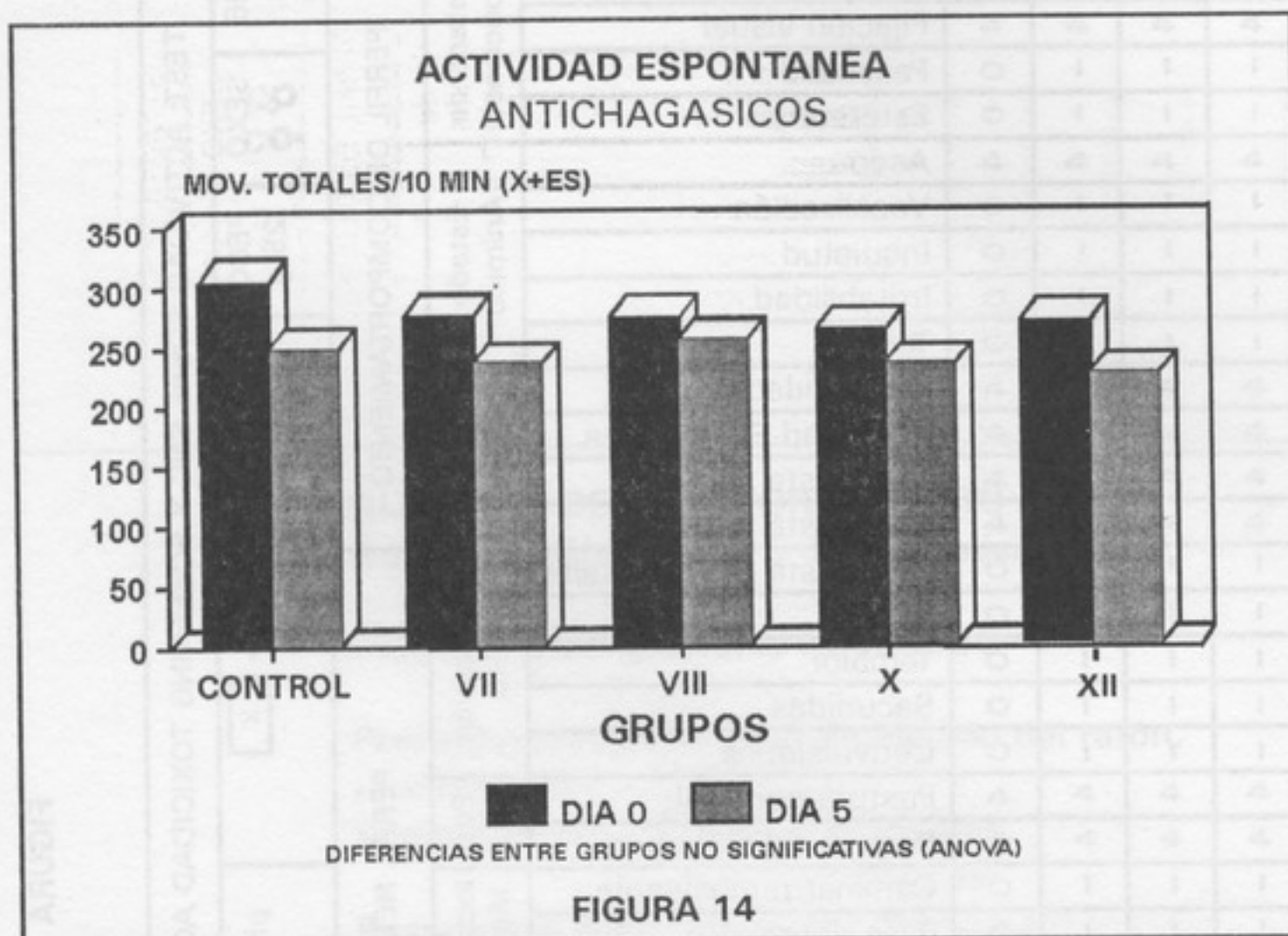
Equipo: Farad-Animex Activity Meter

Canal A: 40 mA (Movimientos totales)

FIGURA 12

FIGURA 13

TEST: ACTIVIDAD SOBRE SNC Y SCREENING TOXICIDAD AGUDA/SUBAGUDA										DROGA/PRODUCTO COMP. X																																			
ESPECIE Ratón Swiss		SEXO 	PESO 25 g	SOL. <input type="checkbox"/>	INSOL. <input checked="" type="checkbox"/>	ph 6		VEHICULO TWEEN 80																																					
PERFIL DE COMPORTAMIENTO					PERFIL NEUROLOGICO																																								
Dosis mg/kg o E.D.H. 100 mg/kg N° animales/dosis: 20	Alerta	Fijación visual	Pasividad	Estereotipo	Aseo	Vocalización	Inquietud	Irritabilidad	Temor	Reactividad	Actividad Espontánea	Respuesta al tacto	Respuesta al dolor	Respuesta de sobresalto	Straub	Temblor	Sacudidas	Convulsiones	Postura corporal	Postura de miembros	Caminar tambaleante	Paso anormal	Reflejo enderezamiento	Tono de miembros	Fuerza al prenderse	Tono corporal	Tono abdominal	Pabellón de la oreja	Reflejo corneal	Flexor ipsilateral	Contorsiones	Tamaño de pupilas	Apertura paroabral	Exoftalmo	Emisión de orina	Salivación	Piloerección	Hipotermia	Color piel	Frecuencia cardíaca	Frecuencia respiratoria	Aguda	Retardada		
SCORE NORMAL	4	4	4	0	0	4	0	0	0	4	4	4	4	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	4	4	0	0	0	0	0	4	4	0	0	
100 mg/kg Día 0	4	4	-	-	4	-	-	-	-	4	4	4	4	-	-	-	-	-	4	4	-	-	-	3	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100 mg/kg Día 3	4	4	-	-	4	-	-	-	-	4	3	4	4	-	-	-	-	-	4	4	-	-	-	4	3	4	4	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100 mg/kg Día 5	5	4	-	-	4	-	-	-	-	4	4	4	4	-	-	-	-	-	4	4	-	-	-	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



EVALUACION DEL COMPORTAMIENTO

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES: Ratones Swiss de 25 g de peso de ambos sexos.

TRATAMIENTOS: Drogas VII - VIII - X - XII.

DOSIS/VIA/TPO.TRAT.: 100 mg/kg, l.p., diariamente durante 5 días.

ENSAYO DE QUIMIOLUMINISCENCIA

Sacrificio: al 5º día de tratamiento.

Material: Muestras de hígado de aprox. 1g en salina 0-2 C.

Homogeinización: Buffer CIK 140 mM, EDTA 1 mM y TRIS-CIH 20 mM pH7.3

Centrifugación: 600g por 10 min a 0-2 C.

Medida de la Emisión: Antes y después del agregado de hidróperóxido de tert-butilo 3mM.

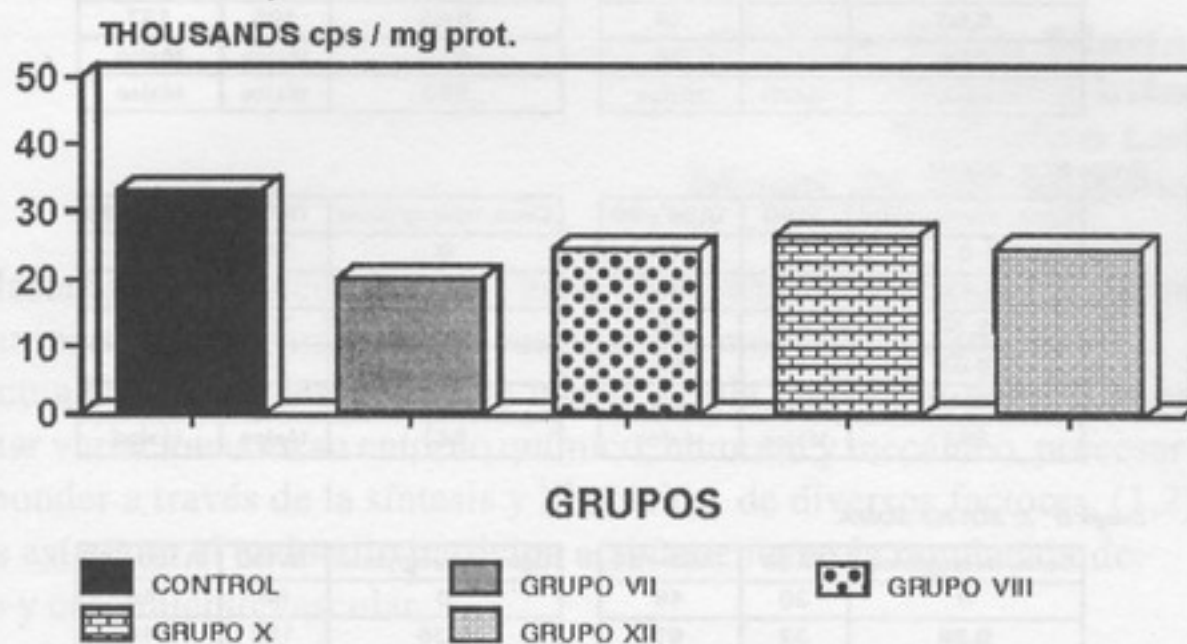
Equipo: Contador de centelleo Packard Tri-carb modelo 3320

Análisis estadístico: ANOVA

FIGURA 15

ENSAYO DE AMES PARA MUTAGENOS ANTICHAGASICOS

ENSAYO DE RADICALES LIBRES ANTICHAGASICOS



DIFERENCIAS ENTRE GRUPOS NO SIGNIFICATIVAS (ANOVA)

Quimioluminiscencia iniciada por
hidroperóxido de tert-butilo

FIGURA 16

PRUEBA DE AMES PARA MUTAGENOS (TEST DE REVERSION DE SALMONELLA)

SET DE CEPAS: SALMONELLA TYPHIMURIUM (His -)

TA - 100 Revierten por sustitución de pares de bases.	TA - 98 Revierten por corrimiento del marco de lectura (deleciones o inserciones de pares de bases).
--	---

MEDIO: GLUCOSA, AGAR BLANDO, His Y BIOTINA

+
CON / SIN ACTIVACIÓN MICROSOMAL HEPATICA (S9)

+
COMPUESTO EN ESTUDIO

↓
MEDIO MINIMO AGAR - BASE (Glu y sales)

CONTROL: SIN MUTAGENO.

CONTROL DE ACTIVIDAD MICROSOMICA: 2 AMINOFLUORENE.

CONTROL DE MUTAGENESIS: N-metil-N'-nitro-N-nitroso guanidina (MNNG).

FIGURA 17

ENSAYO DE AMES PARA DROGAS ANTICHAGASICAS

Droga N° 1: 8CI3P.

Conc. microg/placa	TA98	TA98 + S9
0	22	21
0.426	21	27
2.13	18	20
8.53	23	26
42.6	tóxico	38
853	tóxico	tóxico

Conc. microg/placa	TA100	TA100 + S9
0	107	104
0.426	104	141
2.13	117	99
8.53	106	127
42.6	tóxico	tóxico
853	tóxico	tóxico

Droga N° 2: 8CI3M.

Conc. microg/placa	TA98	TA98 + S9
0	30	48
0.432	30	68
2.16	33	35
8.63	30	68
43.17	tóxico	33
863	tóxico	tóxico

Conc. microg/placa	TA100	TA100 + S9
0	95	148
0.432	114	191
2.16	118	127
8.63	93	106
43.17	tóxico	87
863	tóxico	tóxico

Droga N° 3: 8OCH3 3OMA.

Conc. microg/placa	TA98	TA98 + S9
0	30	48
0.36	32	61
1.8	33	44
7.2	25	53
36	tóxico	38
720	tóxico	tóxico

Conc. microg/placa	TA100	TA100 + S9
0	95	148
0.36	122	148
1.8	95	128
7.2	104	129
36	80	134
720	tóxico	tóxico

Droga N° 4: 8CI2M

Conc. microg/placa	TA98	TA98 + S9
0	25	17
0.355	20	29
1.78	36	11
7.11	18	27
35.5	tóxico	16
711	tóxico	tóxico

Conc. microg/placa	TA100	TA100 + S9
0	69	89
0.355	76	90
1.78	60	77
7.11	66	76
35.5	tóxico	67
711	tóxico	tóxico

Droga N° 5: 8CH3 3M

Conc. microg/placa	TA98	TA98 + S9
0	11	18
0.34	21	16
1.7	15	18
6.8	21	12
34	19	11
680	tóxico	tóxico

Conc. microg/placa	TA100	TA100 + S9
0	69	84
0.34	62	74
1.7	100	69
6.8	66	81
34	73	53
680	tóxico	tóxico

Droga N° 6: 8CH3O 4P

Conc. microg/placa	TA98	TA98 + S9
0	17	48
0.32	17	42
1.6	16	52
6.4	10	41
32	17	35
640	tóxico	tóxico

Conc. microg/placa	TA100	TA100 + S9
0	62	82
0.32	58	75
1.6	55	86
6.4	56	95
32	53	79
640	tóxico	tóxico

FIGURA 18