

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA



**Efecto del pamidronato en ratones
infectados experimentalmente por**
Trypanosoma evansi

Trabajo Especial de Grado
Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
por el bachiller Roberto Andrade F.
como requisito parcial para optar al título
de Licenciado en Biología.
Tutor: Dr. Roschman González

Caracas, Venezuela

Julio - 2010



ACTA

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado por el Consejo de la Escuela Biología para examinar el Trabajo Especial de Grado del Bachiller Roberto Andrade Fernandes, C.I. V-18.837.958, titulado "Efecto del pamidronato en ratones infectados experimentalmente por *Trypanosoma evansi*", nos hemos reunido hoy, 26 de Julio de 2011, en la Sala "Jesús María Pacheco" del Instituto de Zoología y Ecología Tropical de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para atender a la defensa pública de su trabajo, después de lo cual consideramos que amerita la calificación de Veinte (20) puntos. Certificamos así que este Trabajo Especial de Grado cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciado en Biología.

Dra. Marta Mendoza
Jurado

Dr. Gustavo Benaim
Jurado

Dr. Roschman González
Tutor

DEDICATORIA

A mi madre

Que siempre estuvo regalándome su apoyo incondicional, dedicación y hasta parte de su vida para que pudiera salir adelante, sin ella nada de esto hubiera sido posible.

Gracias madre por estar siempre a mi lado, te quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

- A mi tutor y amigo el Dr. Roschman González, por guiar mis pasos durante mi formación académica y ayudarme con la mayor disposición a resolver mis interrogantes, pero por encima de todo gracias por esforzarte todos los días para ser el mejor tutor.
- Al Dr. Héctor Finol, por siempre estar dispuesto a atender mis inquietudes y a compartir sus conocimientos conmigo sin importar el día ni la hora.
- Al Dr. Felix Tejero, por transmitirnos su experiencia y conocimientos desinteresadamente en busca de que el trabajo que se hiciera siempre fuera de calidad.
- Al Lic. Italo Pacheco, por enseñarme con mucho gusto y paciencia todo lo referente al procesamiento de las muestras.
- A la Lic. Mariangelina Zuloaga, por ayudarme y atenderme siempre con la mejor disposición durante las mediciones realizadas en los laboratorios docentes.
- A la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias UCV, por facilitarme el uso de los instrumentos de espectrofotometría de los laboratorios docentes.
- A mis compañeros de laboratorio, Alicia, Freximar, Michelle, Karen, Franchesco, Eglis y Hector, por ayudarme incondicionalmente en el desarrollo de la fase experimental.
- A Pedro Cabello, por contribuir desinteresadamente con el material fotográfico que fue fundamental para el desarrollo experimental de este trabajo.
- A mi novia, amiga, compañera y confidente, Andrea Pastrán, por escucharme, comprenderme, ayudarme y acompañarme en las buenas y en las malas durante el difícil camino de mi carrera.

- A mis amigos de la carrera, Eleinis, Alicia, Raibel, Kimberlyn, Carolina, Migdelis, Robert, Alejandro, Erick, Yaremis y Jennifer por regalarme tantos buenos momentos y hacer más ligero cada día de mi carrera
- A mi padrino Felipe Fernandes, por apoyarme en todo, creer en mí y estar siempre pendiente de cada paso que doy en mi vida.
- A mis amigos, Geronimo Fernández, Alejandro Zambrano, George Solorzano y Antonio Marín, por brindarme su amistad durante todos estos años aun cuando nuestras obligaciones intentaron distanciarnos.
- A mi familia, por apoyarme siempre durante mi carrera y entender mi ausencia en muchas reuniones y celebraciones.

RESUMEN

La tripanosomosis causada por *Trypanosoma evansi* es una enfermedad de carácter endémico con significado económico por cuanto los brotes en equinos se caracterizan por presentar una alta morbilidad y una mortalidad considerable particularmente en los caballos utilizados en actividades de producción primaria como la ganadería bovina extensiva. Desde hace un par de décadas y en los últimos años, se han adelantado gran número de estudios que demuestran la actividad tripanocida de diversas drogas en el manejo terapéutico de la enfermedad generada por el género *Trypanosoma*. Los bisfosfonatos como el Pamidronato forman parte de estas nuevas quimioterapias debido a la capacidad que tienen de acumularse selectivamente en el parásito logrando inhibir enzimas involucradas en el metabolismo del pirofosfato. Son escasos los estudios que evalúan la acción de drogas tripanocidas modernas en infecciones por *T. evansi*. Este trabajo evalúa la actividad del Pamidronato en infecciones murinas experimentales por *T. evansi*.

Ratones ♀-NMRI fueron inoculados intradérmicamente con 100 tripomastigotes/gr de peso corporal. Un día post-inoculación y durante 7 días consecutivos se inocularon vía intraperitoneal 10 mg/Kg de peso corporal de Pamidronato. El peso corporal, el hematocrito y la parasitemia se chequearon interdiariamente desde un día post-inoculación hasta la muerte de los animales infectados. Igualmente, se sacrificó un animal y se le extrajo el riñón izquierdo para ser procesado por la técnica rutinaria de microscopía electrónica de transmisión.

El tratamiento con Pamidronato no indujo disminución estadísticamente significativa en el hematocrito, no obstante, el peso del animal se vio afectado notablemente con el tratamiento, generando un retardo del crecimiento en los murinos juveniles. Adicionalmente, el tratamiento ocasionó un retardo en la aparición de los parásitos en sangre lo que implicaría un aumento en el periodo de prepatencia de la infección. El análisis ultraestructural del riñón de ratones tratados con dosis diarias de pamidronato a 10 mg/Kg por 7 días demostró pérdida en la disposición mitocondrial, así como en las interdigitaciones de los túbulos contorneados proximales.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	9
<i>Tripanosoma evansi</i>	9
Reseña histórica	9
Distribución y Taxonomía	11
Descripción	12
Patogenicidad.....	14
Drogas tripanocidas	15
Inhibidores de la biosíntesis de esteroles (IBE).....	16
Inhibidores de las cistein-proteasas (ICP)	17
Inhibidores de las cistein-proteasas (ICP)	18
Inhibidores del metabolismo de pirofosfato (IMPP).....	19
Efecto del pamidronato en el hospedador	20
Patología renal ocasionada por T evansi	23
ANTECEDENTES	26
OBJETIVOS	28
Objetivo General	28
Objetivos Específicos	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Material Biológico	29
Infecciones Experimentales	29
Experimento <i>in vitro</i>	30
Diseño Experimental	30
Registro del peso de los ratones	31
Procesamiento de la sangre colectada	31
Cuantificación de la parasitemia	32
Cuantificación del calcio sérico	32
Microscopía electrónica de transmisión	33

Fijación	33
Deshidratación	34
Infiltración	34
Inclusión.....	35
Corte y contraste.	35
Manejo numérico de los resultados.....	36
Análisis de la Varianza (ANOVA)	36
RESULTADOS.....	37
I. Efecto del pamidronato en cultivos <i>In vitro</i> de <i>T. evansi</i>	37
II. Determinación de la concentración de pamidronato a utilizar en el ensayo in vivo.....	39
III. Evaluación del pamidronato en infecciones experimentales murinas por <i>T. evansi</i>	41
IIIa. Sobrevida	41
IIIb. Parasitemia	44
IV. Efecto del pamidronato sobre el modelo experimental murino.....	47
IVa. Condición clínica	47
IVb. Peso corporal	48
IVc. Hematocrito.....	51
IVd. Calcio Sérico	54
IVd. Ultraestructura renal.....	57
DISCUSIONES.....	63
I. Efecto del pamidronato en cultivos <i>In vitro</i> de <i>T. evansi</i>	63
II. Determinación de la concentración de pamidronato a utilizar en el ensayo in vivo.....	65
III. Evaluación del pamidronato en infecciones experimentales murinas por <i>T. evansi</i>	67
IV. Efecto del pamidronato sobre el modelo experimental murino.....	69
CONCLUSIÓN.....	76
BIBLIOGRAFÍA	78

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma evansi

- Reseña histórica

Sir Griffith Evans en 1880, observa en la sangre de equinos y camélidos de la región del Punjab (India) que padecían surra, un organismo similar a los espirilos. En escritos posteriores, 1881 y 1882, proporciona una buena descripción de la forma infecciosa en la que reconoce su condición eucariótica. Evans, consideraba que los equinos que padecían surra adquirían la infección al ingerir aguas contaminadas, ya que, repetidamente, había observado masas de “infusorios” en tales muestras de agua. Poco tiempo después (1885) en la antigua Birmania (actual Myanmar), Steel, encuentra en la sangre de mulas que sufrían surra, el mismo organismo, sin embargo, piensa que la enfermedad era una variedad de recaída febril, razón por la cual designa al patógeno “*Spirochaete Evansi*”. En 1886, Crookshank, estudiando las preparaciones originales de Evans, identifica el agente infeccioso y lo denomina *Haematomonas Evansi*, a pesar de lo cual, posteriormente lo refiere como *Trichomonas Evansi*. Balbiani, en el año de 1888, es el primero en ubicar al agente etiológico de la surra en el género *Trypanosoma* (Hoare, 1972).

Las primeras observaciones del *T. evansi* en Venezuela, se podrían remontar a 1826, cuando Llamozas, denomina “epizootia equina” una serie de afecciones caballares con sintomatología de pérdida del control de las extremidades posteriores. Años después, en 1897, Ortega, observa flagelados en la sangre de caninos con manifestaciones clínicas similares, designándolos, “hematozoarios del paludismo equino” (Gómez-Rodríguez, 1956, citado por Brun y col., 1998).

No obstante, el primer estudio sistemático que relaciona al *T. evansi* con patologías equinas se remonta a los albores del siglo XX. Rafael Rangel, observa estos flagelados en la sangre de caballos que padecían “derrengadera” (Rangel, 1905, citado por Brun y col., 1998). El mismo Rangel, envía extendidos de sangre contaminada con el tripanosoma a Felix Mesnil, quien al estudiarlos, encuentra semejanzas notables con el *T. equinun*, agente etiológico del “Mal de Caderas” Sudamericano y, especialmente, con el *T. evansi*, entidad patógena responsable de la surra en el Viejo Mundo. Tomando en consideración estas observaciones, así como el país de procedencia, lo designa *T.*

venezuelense. A pesar de lo cual, no especifica si se trata de una especie nueva o, por el contrario, de una variedad del *T. evansi* (Mesnil, 1910, citado por Brun y col., 1998).

Posteriormente, Leger y Tejera (1920, Brun y col., 1998), publican un detallado estudio en el que comparan muestras de *T. venezuelense* y *T. evansi*. Los resultados expresan diferencias morfológicas, inmunológicas y de reactividad farmacológica diferencial, concluyendo en consecuencia, que se trata de especies diferentes.

Lavier (1929, citado por Brun y col., 1998), al estudiar las mismas muestras investigadas por Leger y Tejera (*op. cit.*), establece que las diferencias morfológicas reportadas, no justifican la separación específica. Más aun, considera que la heterogeneidad patogénica descrita en animales de laboratorio, se debe a cambios sobrellevados por los flagelados a lo largo de su mantenimiento por pasajes seriados en hospedadores experimentales.

Estudios posteriores llevados a cabo por Hoare (1937, 1939, 1950, 1954, 1964, citado por Hoare 1972), establecieron que *T. hippicum*, *T. equinum*, *T. venezuelense* y *T. evansi*, son indistinguibles en términos morfológicos. Por ende, el autor concluye que las diferentes denominaciones específicas referidas en la literatura, representarían “razas” geográficas y constituyen, en consecuencia, sinonimias de *T. evansi*. Investigaciones posteriores (Mahmoud y Gray, 1980; Losos, 1980; Molyneux y Ashford, 1983), confirman los argumentos esgrimidos por Hoare (*loc. cit.*), acerca de la sinonimia.

En la actualidad se conoce que los tripanosomas son parásitos unicelulares de gran importancia en veterinaria, debido a que tienen la capacidad de infectar a una gran variedad de mamíferos, entre los que se incluyen caballos, mulas, camellos, búfalos, venados y ganado doméstico (Forlano y col., 2011). *Trypanosoma evansi* es un hemoflagelado con distribución mundial y causa patologías animales de gran importancia económica en África, Asia y Sur América (Brun y col., 1998). En nuestro país este parásito es de particular importancia, debido a que presenta una alta seroprevalencia y se encuentran ampliamente distribuidos en la región de los llanos (Reyna-Bello y col., 1998), siendo los chigüires los principales hospedadores en Venezuela (Arias y col., 1997). *T. evansi* es el agente etiológico de la tripanosomosis equina, denominada “derrengadera” en los llanos de nuestro país.

- Distribución y Taxonomía

Hoare (1972), indica que el *T. evansi* es el tripanosoma más ampliamente distribuido. El mapa siguiente evidencia la aseveración del autor (Figura 1).



Figura 1. Regiones geográficas y, resaltado en rojo, distribución del *Trypanosoma evansi* (modificado de <http://www.fao.org/>).

Hoare (1964) realizó una clasificación que fragmenta al género *Trypanosoma* en dos Secciones, Stercoraria y Salivaria. Sin embargo, esta carece de valor taxonómico pero si de gran valor práctico en el estudio de los tripanosomas infectantes de mamíferos. La sección Stercoraria contiene a los tripanosomas transmitidos por las heces del hospedador invertebrado, a diferencia de la sección Salivaria que incluye solo a los tripanosomas que son transmitidos por inoculación de saliva infectada. *T. evansi* pertenece a la sección Salivaria.

Brusca y col. (2003), proponen recientemente una nueva clasificación taxonómica de *T. evansi*, pudiéndose clasificar de la siguiente manera:

Dominio: Eukarya

Reino: Protozoa

Phylum: Kinetoplastida

Familia: Trypanosomatidae

Género: Trypanosoma

Especie: Trypanosoma evansi

- Descripción

Trypanosoma evansi es un protozoo hemoflagelado de importancia veterinaria debido a que infecta a una variedad de grandes mamíferos entre los que se incluyen caballos, camellos, búfalos, venados y ganado doméstico, causando la enfermedad conocida como derrengadera (Forlano y col., 2011). Morfológicamente se describe como una especie monomórfica oblonga ($18-36 \mu\text{m} \times 3-5 \mu\text{m}$) que se distingue por su extremo posterior relativamente cónico, núcleo central, una membrana ondulante bien desarrollada y un flagelo libre que contribuye en su locomoción (Figura 2).

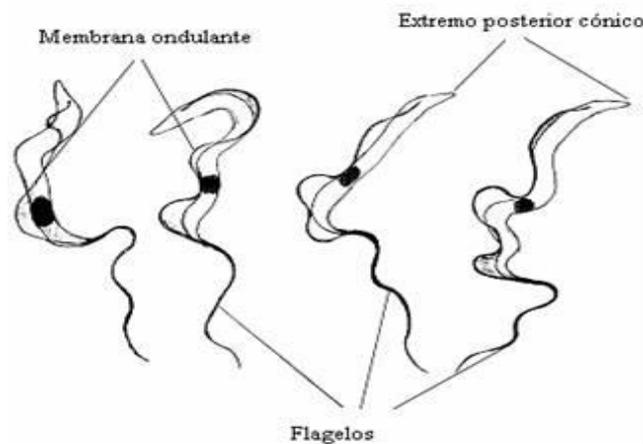


Figura 2. Dibujos esquemáticos de *Trypanosoma evansi*
(Modificado de www.cpap.embrapa.br).

Observaciones del *T. evansi* con el microscopio electrónico de transmisión, evidencian el corsé de microtúbulos subpeliculares, la barra paraxial, una mitocondria única que se extiende a todo lo largo de la célula, alojando en las cercanías del cuerpo basal del flagelo al cinetoplasto; también se observa el aparato de Golgi, los acidocalcisomas, los glicosomas, múltiples ribosomas y vacuolas diversas (Figura 3A). Micrografías por microscopía electrónica de barrido muestran con mayor resolución la forma alargada, el flagelo libre y la membrana ondulante que presenta característicamente el género *Trypanosoma* (Figura 3B).

Otras especies de tripanosoma como *T. brucei brucei* presentan forma alargadas con características morfológicas muy similares a *T. evansi*, siendo indiferenciables para algunos autores (Hoare, 1972). Además, se ha descrito que las cepas de parásitos provenientes de diferentes áreas geográficas y de diferentes hospedadores son morfológicamente indiferenciables en *T. evansi* (Hoare, 1964).

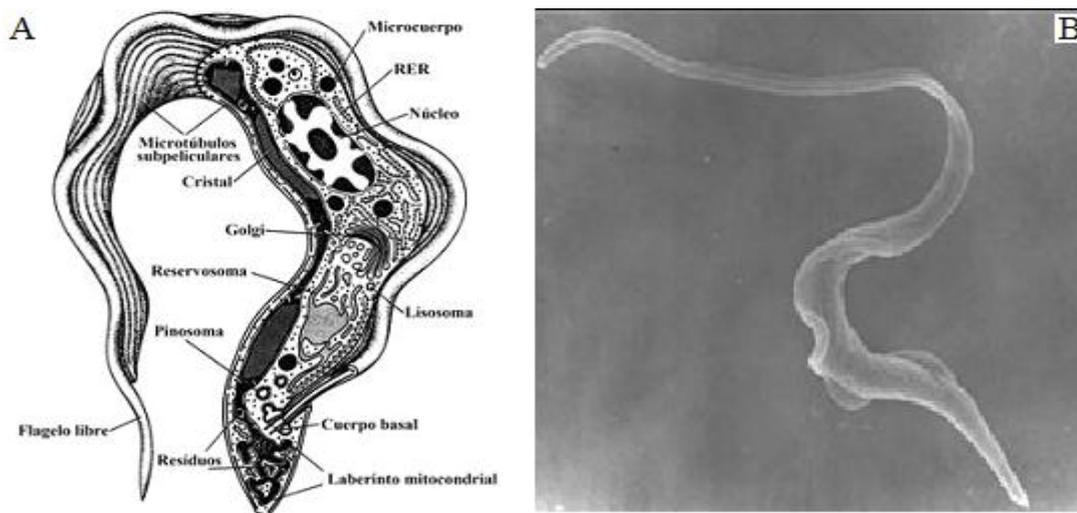


Figura 3. Tripomastigote de *Trypanosoma evansi*. A. Representación esquemática (Modificado de Vickerman, 1977). B. Micrografía de microscopía electrónica de barrido (Cortesía de F. Tejero).

El ciclo de vida del *T. evansi* se caracteriza por carecer de una etapa desarrollo en el invertebrado. Los dípteros succionadores de sangre pueden transmitir mecánicamente *T. evansi* de un hospedador infectado a otro sano. La mosca del caballo (*Tabanus spp.*) la mosca de la paleta (*Haematobia irritans*) y la mosca de los establos (*Stomoxis spp.*) figuran como los principales vectores de este hemoflagelado (Brun y col., 1998). Por su parte, en el hospedador vertebrado, la multiplicación acontece en el torrente circulatorio por fisión binaria longitudinal simple de tripomastigotes, único estadio descrito (Figura 4).

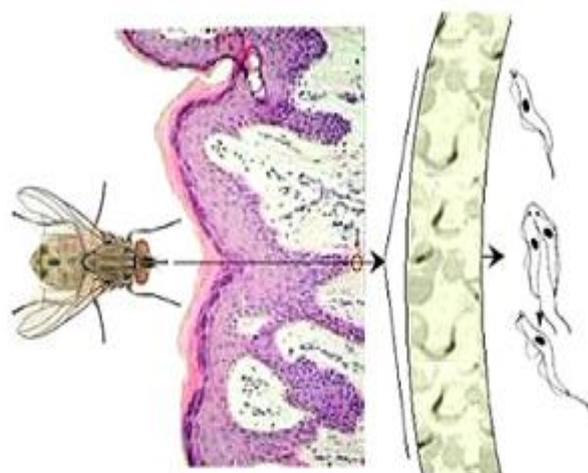


Figura 4. Esquema del ciclo de vida de *Trypanosoma evansi* (Modificado de Gardiner y col., 1988).

- Patogenicidad

El establecimiento de una infección natural por *T. evansi* ocurre en tres etapas: periodo de prepatencia, fase aguda y fase crónica (Dwight y col., 2004). Primero se produce un periodo de prepatencia o de incubación, que se extiende desde la contaminación hasta la aparición de los parásitos en sangre. Posteriormente, el animal entra en una fase aguda caracterizada por alto contenido de parásitos en sangre y sintomatología. El periodo final de la afección ocurre en una fase crónica, en donde se presenta una disminución de la parasitemia y una ausencia de síntomas, pudiéndose mantener el parásito en el hospedador convirtiéndolo en un reservorio.

En caballos y asnos el período prepatente se extiende de 5 a 60 días. Es usual que los animales con infección aguda por *T. evansi* mueren luego de semanas o meses, y en menor medida, en el transcurso de años.. En el caso de los caballos, la fase aguda es corta y severa (dos a dieciséis semanas), caracterizándose por letargo, anemia, parálisis progresiva, adenopatías, edema, urticaria, alopecia y exudación (Losos, 1980; Mahmoud y Gray, 1980), entre otras manifestaciones clínicas características como la pérdida en el control del tren posterior (Figura 5). En Venezuela, algunos autores argumentan que los chigüires pueden comportarse como reservorios, pues aun cuando estos no pasan por una fase aguda pueden mantenerse por mucho tiempo infectado con bajas parasitemias (Arias 1997).



Figura 5. Tripanosomosis equina. A. “Mal de cadeira” en un potro de Río Grande, Brasil. (Rodríguez y col., 2005). B. “Derrengadera” en un caballo del Estado Apure, Venezuela (Cortesía de T. Perrone).

Drogas tripanocidas

La tripanosomosis causada por *T. evansi* es una enfermedad causante de brotes con alta morbilidad en caballos y con amplia distribución geográfica en regiones de América del Sur dedicadas a la explotación de ganadería bovina extensiva, generando así grandes pérdidas económicas (Forlano y col., 2011). Por esta razón el género *Trypanosoma* está asociado con los daños infligidos, directa y/o indirectamente, a los seres humanos, hecho que lo ha convertido en tema central de numerosas investigaciones, orientadas primordialmente, a su erradicación (Urbina, 2002; Urbina y Docampo, 2003).

El uso de drogas para la prevención y tratamiento de la tripanosomosis animal ha sido importante durante muchas décadas, pero la rapidez con la que los tripanosomas han desarrollado resistencia a cada droga introducida ha complicado tremendamente esta alternativa para controlar la enfermedad (Peña y col., 2000).

A pesar de esto, algunas de las drogas quimioproliféricas más antiguas como los derivados de quinapiramina son usados todavía y dan protección efectiva contra la infección con *T. brucei* en caballos, camellos y ganados (Peña y col., 2000). La efectividad de estas drogas tipo amina radica en que tiene la capacidad de interferir selectivamente con el metabolismo energético del parásito, al intercalarse entre las hélices del ADN e inhibir su replicación.

La droga quimioproliférica más utilizada y también la menos costosa es el cloruro de isometamidio, una mezcla entre la dimenazina y homidio conocida comúnmente con nombres comerciales como Samorin y Trypamidium (Goodman, 1990). Estos compuestos tienen la capacidad de intercalarse selectivamente entre las hélices de las cadenas de los ácidos nucleicos bloqueando los procesos de replicación.

Algunos derivados arsenicales como la melarsomina, también han sido utilizados en el tratamiento de la tripanosomosis animal (Litter, 1997). Estos compuestos reaccionan con los grupos sulfhidrilos de las proteínas inactivando un gran número de enzimas.

A pesar de que todas estas drogas tienen actividad profiláctica y terapéutica, los altos costos y toxicidad que estas generan en los hospedadores, sugieren que esta solución es insatisfactoria a largo plazo. Efectos secundarios como, altos valores de tiempo de vida media, excreción tardía en el riñón y acumulación de estas drogas en los tejidos son solo algunos de los que pueden presentarse en el hospedador (Litter, 1997). Estos hechos demuestran la urgente necesidad de desarrollar nuevos tratamientos específicos muchos más eficaces y selectivos, en busca de un fármaco con potente actividad tripanocida y que genere un mínimo daño al hospedador.

En la última década, gracias al conocimiento íntimo en aspectos bioquímicos y fisiológicos que se tiene del agente etiológico, han surgido nuevas drogas que muestran resultados alentadores. Estas se clasifican en cuatro grupos según su mecanismo de acción: inhibidores de la biosíntesis de esteroides (IBE), inhibidores de las cistein-proteasas (ICP), inhibidores de purinas (IP) e inhibidores del metabolismo de pirofosfato (IMPP).

- Inhibidores de la biosíntesis de esteroides (IBE)

Al estudiar la bioquímica y el metabolismo de los tripanosomatídeos se ha conocido que estos requieren incorporar esteroides específicos en sus membranas para la proliferación celular, por lo cual serían extremadamente sensibles a los IBE. Estos compuestos actúan inhibiendo a la enzima C14 α -desmetilasa, que es la encargada de mediar la reacción de transformación del epóxido de escualeno a lanosterol, metabolito fundamental para la síntesis de esteroides (Urbina y Docampo, 2003; Coppens y Courtoy, 2000). En este grupo se incluyen drogas como: ketoconazol, itraconazol, así como otros antifúngicos.

Algunos estudios de eficacia *in vitro* y sobretodo *in vivo* con estas drogas, han demostrado resultados controversiales (Urbina y Docampo, 2003). En Chile, el uso de itraconazol (a una dosis de 6 mg/kg/d por 120 días) en pacientes crónicos de chagas, redujo el número de xenodiagnósticos positivos y logró prevenir anomalías en el electrocardiograma (Apt y col., 1998; Apt y col., 2003). Adicionalmente, los IBE son capaces de inducir cura parasitológica radical en modelos murinos, tanto en la fase aguda como en fase crónica de la enfermedad, siendo capaces de erradicar cepas

resistentes a nitrofuranos y a nitroimidazoles en ratones infectados, aún si estos están inmunosuprimidos (Urbina, 2002; Urbina y col., 2003). Desde el punto de vista farmacológico, los IBE tienen excelentes propiedades farmacocinéticas: concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) bajas (rango nanomolar a subnanomolar), T_{1/2} larga (25 – 120 horas), un alto volumen de distribución (500 - 1300 L para el posaconazol), y una extensa distribución en tejidos.

Sin embargo, algunos autores han afirmado que estas drogas no son suficientemente potentes para eliminar a *T. cruzi* en animales y humanos en fase crónica o detener la progresión de la enfermedad (Britto y col., 2001; Braga y col., 2000; Lauria-Pires y col., 2000). En todo caso, es importante mencionar que, si bien, los pacientes mantuvieron serología positiva para *T. cruzi*, en una evaluación con nueve años de seguimiento, se evidenció una marcada reducción de la carga parasitaria y muy pocos o ningún efecto adverso (Apt y col., 1998; Apt y col., 2003).

- Inhibidores de las cistein-proteasas (ICP)

Las cisteín-proteasas son hidrolasas que degradan proteínas a partir de la ruptura de los enlaces peptídicos y poseen en su sitio activo un aminoácido de cisteína esencial para su actividad enzimática. Las proteasas de este tipo desempeñan múltiples funciones prácticamente en todos los aspectos de la fisiología y el desarrollo de un organismo. Particularmente en los tripanosomatídeos estas enzimas se han relacionado con la sobrevivencia, crecimiento y la proliferación del parásito durante la infección (Cazzulo y col., 2001; Caffrey y col., 2000); por esta razón los inhibidores de cistein-proteasas son candidatos interesantes como drogas tripanocidas

Los hallazgos conseguidos con este tipo de drogas surgen por el estudio de la bioquímica de *T. cruzi* y el descubrimiento de la cruzipaina, una cathepsin cisteínproteasa responsable de la actividad proteolítica de este parásito. Así, los inhibidores de estas proteasas bloquean la proliferación tanto de epimastigotes extracelulares como amastigotes intracelulares. Ellos detienen la metaciclologénesis in vitro. Esta proteasa, la cruzipaina, cumple un papel esencial en la sobrevivencia y crecimiento de *T. cruzi* (Cazzulo y col., 2001; Caffrey y col., 2000).

Se ha observado que los inhibidores de cistein proteasas pueden inducir cura parasitológica en modelos murinos de enfermedad aguda y crónica, con toxicidad mínima (Cazzulo y col., 2001; Caffrey y col., 2000). En este grupo de drogas se encuentran las thio-alquil-semicarbazonas cíclicas, las cuales también inhiben la cruzipaina (Du y col., 2002)

Otra propiedad que caracteriza a este grupo de drogas (ICP) es ser compuestos activos en el rango nanomolar, teniendo actividad tripanocida contra amastigotes intracelulares en células de mamíferos *in vitro* (Du y col., 2002)

A pesar de las excelentes propiedades y los buenos resultados obtenidos con los ICP, las drogas de este tipo con actividad tripanocida son escasas, por ello es necesario continuar con el diseño y evaluación de nuevos compuestos en búsqueda de inhibidores reversibles e irreversibles de más potencia y especificidad (Cazzulo y col., 2001).

- Inhibidores de purinas (IP)

Los *Trypanosomatidae* son totalmente deficientes en la biosíntesis *de novo* de purinas. Para poder obtener las purinas hacen uso de intermediarios metabólicos. La hipoxantin-guanin-fosforibosil transferasa (HGPRT) es una enzima clave en la síntesis de purinas, que puede ser inhibida por sustancias como el alopurinol (este se convierte a oxipurinol el cual es un potente inhibidor de la xantina oxidasa). En los *Trypanosomatidae* el alopurinol actúa como un análogo de purina, siendo incorporado en el ADN del parásito, luego de lo cual ocurre la interrupción de la síntesis de ARN y proteínas. (Stoppani, 1999; Apt y col., 2003)

Se ha demostrado la actividad tripanocida *in vivo* del alopurinol (Stoppani, 1999; Apt y col., 2003). Sin embargo, se han notificado resultados controversiales en humanos. Estudios demuestran que se puede conducir a la desaparición del xenodiagnóstico positivo en pacientes si se utilizan 8,5 mg/kg/d por 60 días de esta droga, lográndose revertir (49%) y prevenir (75%) el desarrollo de anomalías cardíacas en un seguimiento hecho por 9 años con infecciones por *T. cruzi*. (Apt y col., 1998; Apt y col., 2003; Lauria-Pires y col., 2000).

- Inhibidores del metabolismo de pirofosfato (IMPP)

Los *Trypanosomatidae* y los *Apicomplexa* tienen organelos especializados llamados acidocalcisomas, involucrados en el almacenamiento de polifosfato y cationes; y en la adaptación del microorganismo al estrés ambiental (Docampo, 2001 y Mendoza y col., 2002). Estos organelos poseen un arsenal de canales, intercambiadores y transportadores que le permiten cumplir su función osmoreguladora (Docampo, 2008). La presencia de una ATPasa vacuolar ($V\text{-H}^+\text{-ATPasa}$) y una pirofosfatasa vacuolar ($V\text{-H}^+\text{-PPasa}$) permite que se establezca un gradiente de protones. El transporte de Ca^{2+} es realizado por una $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$. Otros transportadores incluyen intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, un canal de Cl^- y un canal de agua o acuaporina. Es posible la existencia de otros transportadores como los de aminoácidos básicos, P_i , PP_i y otros cationes (Figura 6).

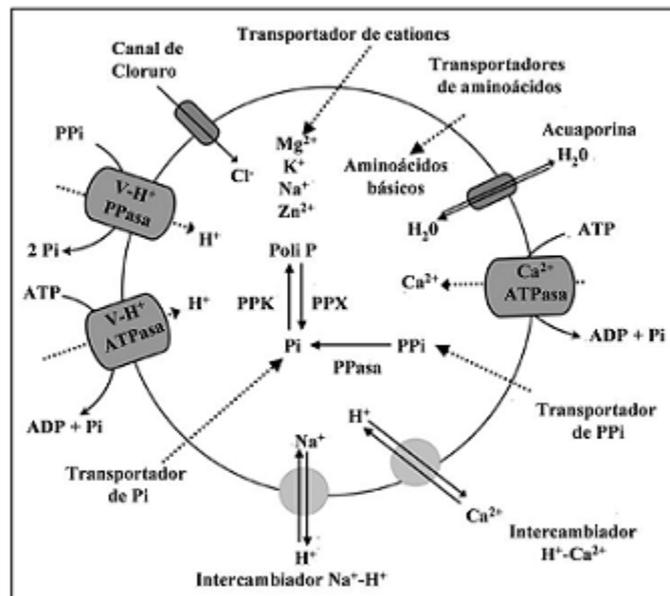


Figura 6. Representación esquemática de un acidocalcisoma (Tomado de Docampo, 2008)

La matriz de los acidocalcisomas es rica en PP_i , poli-P y en enzimas involucradas en su metabolismo, como la poli-P cinasa (PPK), la exopolifosfatasa (PPX) y las pirofosfatasa (PPasa). Tanto las pirofosfatasa solubles como las vacuolares dependen de PP_i para ejercer su actividad. Es por esto que estas enzimas han sido consideradas blancos terapéuticos de gran potencialidad por existir inhibidores contra la actividad de estas moléculas (Docampo, 2008).

Los bisfosfonatos son drogas usadas frecuentemente en el tratamiento de los trastornos de reabsorción ósea (como la osteoporosis) y por ser análogos no hidrolizables del pirofosfato son inhibidores de las pirofosfatasas (Rodan y Martin, 2000). Entre este grupo de drogas se encuentran: Alendronato (Fosamax®, MSD), Risedronato (Actonel®, Aventis), Pamidronato (Aminomux®, Leti), Ibandronato (Bondronat®, Roche), entre otras.

En *Trypanosomatidae* se han realizado diversos trabajos (Martin y col., 2001; Docampo, 2001; Montalvetti y col., 2001; Urbina, 2002) que demuestran que los bisfosfonatos también pueden acumularse selectivamente en estos parásitos, inhibiendo pirofosfatasas vacuolares como la farnesil-pirofosfato sintetasa y produciendo una potente actividad tripanocida. El alendronato es de estas drogas, la única con muy poca actividad tripanocida, las demás han demostrado una potente actividad, siendo el risendronato el bisfosfonato que ha demostrado mejores resultados (Martin y col., 2001; Docampo, 2001; Montalvetti y col., 2001; Urbina, 2002)

Efecto de los bisfosfonatos en el hospedador

Los bisfosfonatos son análogos estructurales del pirofosfato en los que el oxígeno central ha sido sustituido por carbono (Figura 6). Estos se caracterizan por tener un esqueleto P-C-P en donde existen uniones covalentes entre un átomo de carbono y dos de fósforo. Los compuestos de este tipo son muy estables, resistentes a la hidrólisis enzimática y se combinan con alta afinidad con cristales de hidroxiapatita (Reszca, 2005).

La estructuración de estos compuestos ha sido relacionada con la eficacia con la que pueden unirse a los osteoclastos en el proceso de resorción ósea. Los radicales R1, unidos covalentemente al núcleo P-C-P, influyen en la afinidad por el hueso. Los grupos hidroxilo (OH) parecen aumentar la fijación, mientras que el Cl la reduce. Por otro lado, el radical de cadena R2 ha sido relacionada con la potencia de los diferentes bisfosfonatos (Figura 7) (Reszca, 2005).

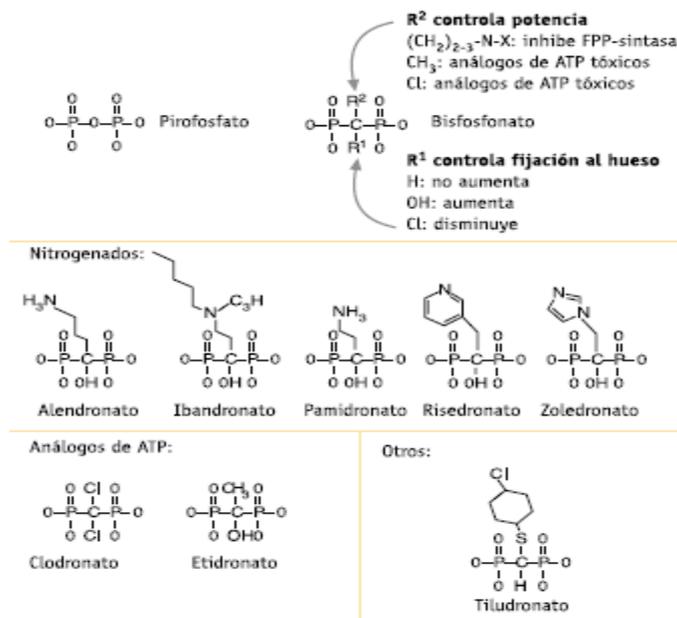


Figura 7. Estructura de los Bisfosfonatos (Tomado de Reszca, 2005)

La resorción ósea es el proceso por el cual los osteoclastos eliminan tejido óseo liberando minerales, resultando en una transferencia de ión calcio desde la matriz ósea a la sangre (Riancho, 2002; Torregrosa y Ramos, 2010). Los osteoclastos son células multinucleadas que contienen numerosas mitocondrias y lisosomas. Son las responsables de la destrucción del tejido óseo, en contraposición con los osteoblastos, que son las responsables de la creación del mismo. Los osteoclastos se adhieren al tejido óseo y comienzan a secretar colagenasas y otras enzimas importantes en el proceso de resorción de tejido óseo. Los iones de calcio, magnesio, fosfato y los productos del colágeno son endocitados por el osteoclasto y liberados en el líquido extracelular, provocando la desmineralización del tejido óseo.

Los bisfosfonatos, tienen la capacidad de inhibir los procesos de resorción ósea. Los bisfosfonatos no nitrogenados como el etidronato y el clodronato, son captados por los osteoclastos y convertidos en análogos tóxicos de ATP. Por otro lado, los bisfosfonatos nitrogenados actúan inhibiendo la farnesil pirofosfato sintetasa, y otros pasos finales de la vía intracelular del mevalonato, cuyo producto final es el colesterol. Esta ruta metabólica es de gran importancia en la función y la supervivencia de los osteoclastos. (Torregrosa y Ramos, 2010; Jódar y col., 2002; Green, 2004).

La disminución de calcio en el hueso generada por el proceso de resorción ósea, hace necesaria una mayor demanda de este ion por parte de los osteoblastos, para que ellos puedan reponer el calcio perdido por el tejido óseo. Es por esto que en pacientes humanos que tengan esta afección el tratamiento por bisfosfonatos se encuentran contraindicados en caso de hipocalcemia. Antes de iniciar el tratamiento con el bisfosfonato se recomienda corregir la hipocalcemia y otros trastornos del metabolismo de los minerales como la deficiencia de vitamina D (Arrabal, 2007; Torregrosa y Ramos, 2010).

Esta particularidad en el tratamiento por bisfosfonatos requiere que es fundamental el monitoreo del calcio sérico en el modelo experimental durante la infección por T evansi. Las concentraciones de este ion en suero deben mantenerse entre 7,1 y 10,1 mg/dL en ratones (<http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html>) para evitar patologías en el organismo.

Por otro lado, los bisfosfonatos en general han sido asociados con toxicidad renal, pudiendo ocasionar una falla renal severa. Este efecto colateral ha sido relacionado con una dosis excesiva de bisfosfonatos en modelos murinos. Entre las patologías renales reportadas por bisfosfonatos como el pamidronato son glomeruloesclerosis focal y segmentaria, además de una degeneración y necrosis tubular. Estas alteraciones pueden ser parcialmente reversibles a bajas dosis y mejoran al suspender el tratamiento (Torregrosa y Ramos, 2010).

La glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS) se refiere a un proceso patológico de cicatrización del glomérulo, componente fundamental en el proceso del filtrado en el riñón (Thomas y col., 2006). El término "focal" significa que algunos de los glomérulos resultan cicatrizados, mientras que otros permanecen normales. Por otro lado, el término "segmentaria" se refiere a que sólo parte de un glomérulo individual resulta dañado. Estos aspectos presentados en conjunto caracterizan a la glomeruloesclerosis focal y segmentaria.

Dependiendo de la causa, la GEFS se puede clasificar de forma general en primaria y secundaria. Primaria, cuando no se encuentra una causa base y por lo general se presenta como un síndrome nefrótico, y secundaria cuando se identifica una causa y

tiende a presentarse con proteinuria e insuficiencia renal. Esto es consecuencia en realidad de un grupo heterogéneo de trastornos tales como infecciones por el VIH, toxinas y drogas, tales como la heroína y el pamidronato, formas hereditarias, pérdida del nefrón e hiperfiltración, tal como sucede con pérdida del nefrón e hiperfiltración, tal como sucede con la pielonefritis crónica, obesidad mórbida y la diabetes mellitus (Thomas y col., 2006).

A pesar de los efectos secundarios ocasionados por los bisfosfonatos en humanos pueden ser manejados a nivel clínico, existiendo pacientes con tratamiento por este fármaco durante meses sin mayores complicaciones. Así, los posibles daños en riñón reportados por el uso de bisfosfonatos, sugieren que el estudio de las patologías renales que puede producir la actividad del medicamento es fundamental para comprobar para comprobar el éxito del estudio.

Patología renal ocasionada por *T. evansi*

El riñón es el órgano excretor de los mamíferos y su función principal es filtrar la sangre del aparato circulatorio de los diversos residuos metabólicos del organismo, como lo son la urea, la creatinina, el potasio y el fósforo. Esto puede ser posible gracias a que el tejido renal posee un complejo sistema que incluye mecanismos de filtración, reabsorción y excreción, teniendo como producto la orina (Eckert y col., 1999).

La orina contiene agua y otros subproductos del metabolismo, como la urea, además de NaCl, KCl, fosfatos y otras sustancias que estén presentes en concentraciones que excedan de los requerimientos del cuerpo. El objetivo de este órgano es mantener una composición corporal aproximadamente constante; por ello, el volumen y la composición de la orina reflejan el volumen del líquido captado y la cantidad y composición del alimento ingerido (Castellanos y col., 2002).

La unidad funcional del riñón de mamíferos es la nefrona, un intrincado tubo epitelial que está cerrado por el extremo inicial, pero abierto por la parte distal. Estas pueden dividirse en tres regiones principales: la nefrona proximal, el asa de Henle y la nefrona distal. Cada riñón posee numerosas nefronas que vacían a conductos colectores. Estos conductos se unen para formar los conductos papilares, que vacían finalmente en

la pelvis renal. De esta manera y con la contribución de los demás componentes de este órgano es posible el ultrafiltrado de la sangre y así la excreción del material de desecho (Silverthorn, 2008)

La descripción funcional del riñón nos indica la importancia fundamental que este órgano representa para el mamífero. La presencia de alteraciones renales pudiera representar una deficiencia en la elaboración de los procesos de excreción y filtrado, ocasionando graves problemas en el funcionamiento del organismo. Por esto es relevante considerar los posibles daños producidos por el parasito, adicionalmente al ya generado por el tratamiento con pamidronato.

Las investigaciones histológicas y ultraestructurales referentes al riñón de animales infectados con *T. evansi* son escasas. No obstante, un par de autores indican que las alteraciones renales en perros podrían ser el resultado de toxinas parasitarias y/o de la actividad del propio *T. evansi* (Srivastava y col., 1969 y Suryanarayana y col., 1986). Otras publicaciones informan de glomerulonefritis ligera, degeneración tubular y necrosis en camellos (Sakr y col., 1991), así como acción directa del hemoflagelado en combinación con la respuesta inmune desencadenada por hospedadores lagomorfos (Uche y col., 1992).

Trabajos recientes han demostrado que la afección ocasionada por *T. evansi* puede causar falla renal aguda en un hospedador murino a partir de la evaluación ultraestructural del tejido renal. (Tejero, 2009). Entre las patologías encontradas se pueden mencionar la perdida de la asociación entre las mitocondrias y la membrana plasmática, ausencia de la disposición característica de las interdigitaciones la presencia de mitocondrias polimórficas y gotas lipídicas en el túbulo contorneado proximal (Figura 8).

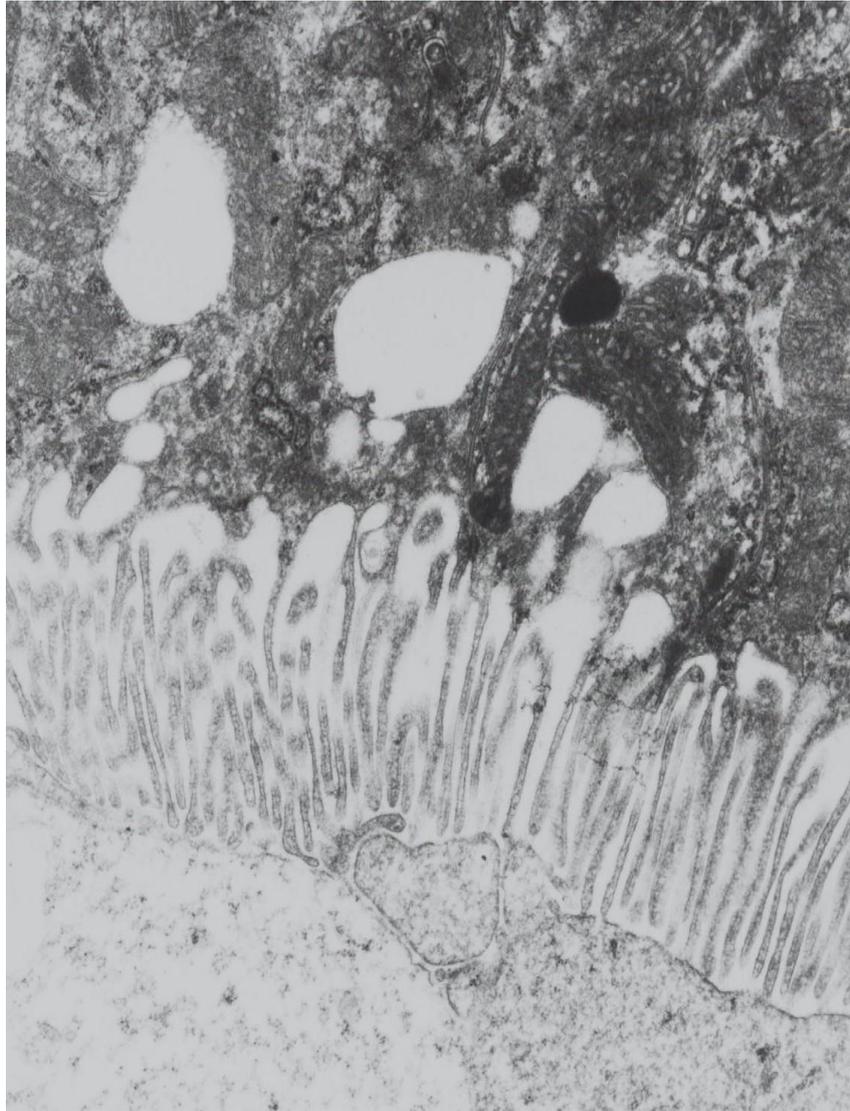


Figura 8. Alteraciones ultraestructurales en riñón en infecciones experimentales murinas por *T. evansi* (Cortesía F. Tejero)

Estas lesiones están asociadas a glomerulonefritis y atrofia tubular. Se sugiere que mecanismo de estas patologías está relacionado a depósitos del componente 3 del complemento (C3). Además, el daño glomerular puede disminuir la función tubular, permitiendo en consecuencia, el desarrollo de nefritis, condición que facilitaría la entrada de toxinas y/o complejos inmunes vía túbulos contorneados proximales (Facer y col., 1978; Van Marck y Verboot, 1980).

ANTECEDENTES

- Actividad tripanocida de los bisfosfonatos

Los primeros estudios que se realizan para evaluar el efecto de los bisfosfonatos en tripanosomatideos se le acreditan a Urbina y col. (1999). Ellos demostraron los bisfosfonatos tienen la capacidad de inhibir la proliferación de amastigotes de *T.cruzi*. y disminuir la parasitemia. Bouzahzah y col. (2005) obtienen resultados similares utilizando risendronato para el tratamiento del chagas en un modelo murino. En el mismo año Kotsikorou y col. (2005) observan un aumento en la sobrevivida de ratones infectados con *T. brucei* al ser tratados con diferentes bisfosfonatos.

Yadley y col. (2002) probaron el efecto de bisfosfonatos en *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii* obteniendo un aumento en la sobrevivida de murinos. En otros estudios con *Leishmania*, Rodriguez y col. (2002), demuestran el efecto del pamidronato en lesiones cutáneas causadas por este parásito, obteniéndose la cura total de la infección.

Las investigaciones realizadas sobre *T. evansi* concernientes a la evaluación del efecto de bisfosfonatos son muy escasas. Mendoza y col. (2008) realizaron estudios con risendronato en ratones infectados con *T. evansi*, logrando una disminución en los niveles de parásitos en sangre y un aumento en la sobrevivida de los animales.

- Efectos colaterales de los bisfosfonatos

Son escasos los estudios realizados sobre la evaluación de los efectos colaterales generados por el uso de bisfosfonatos. Las investigaciones realizadas en este ámbito se restringen casi exclusivamente a las empresas farmacéuticas. Novartis ® en su presentación de pamidronato disódico advierte la insuficiencia renal que puede causar este fármaco, generada principalmente por el uso inadecuado de la dosis. Entre las patologías renales reportadas son glomeruloesclerosis focal y segmentaria, además de una degeneración y necrosis tubular.

Además, se ha demostrado que el tratamiento por bisfosfonatos en pacientes humanos se encuentra contraindicado en caso de hipocalcemia. Por esto, antes de iniciar el tratamiento con el bisfosfonato se debe corregir la hipocalcemia y otros trastornos del metabolismo de los minerales como la deficiencia de vitamina D (Arrabal, 2007).

- Patologías renales ocasionadas por *T. evansi*

Las investigaciones histológicas y ultraestructurales referentes al riñón de animales infectados con *T. evansi* son escasas. No obstante, un par de autores indican que las alteraciones renales en perros podrían ser el resultado de toxinas parasitarias y/o de la actividad del propio *T. evansi* (Srivastava y col., 1969 y Suryanarayana y col., 1986). Otras publicaciones informan de glomerulonefritis ligera, degeneración tubular y necrosis en camellos (Sakr y col., 1991), así como acción directa del hemoflagelado en combinación con la respuesta inmune desencadenada por hospedadores lagomorfos (Uche y col., 1992).

Aunado a esto, estudios recientes han demostrado que *T. evansi* también puede producir fuertes alteraciones en el tejido renal de roedores. Tejero y col. (2009) demuestran que infecciones por *T. evansi* pueden producir lesiones como glomerulonefritis y atrofia tubular. Se sugiere que mecanismo de estas patologías está relacionado a depósitos del componente 3 del complemento (C3). Algunos autores aseguran que el daño glomerular puede disminuir la función tubular, permitiendo en consecuencia, el desarrollo de nefritis, condición que facilitaría la entrada de toxinas y/o complejos inmunes vía túbulos contorneados proximales que pueden evolucionar hasta producir la muerte del animal (Facer y col., 1978; Van Marck y Verboot, 1980).

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto del pamidronato en ratones infectados experimentalmente por *Trypanosoma evansi*.

Objetivos Específicos

- Comprobar la actividad tripanocida del pamidronato en cultivos *in vitro* de *Trypanosoma evansi*.
- Evaluar el efecto del pamidronato sobre la parasitemia y sobrevida en ratones infectados por *T. evansi*.
- Evaluar el efecto del tratamiento con pamidronato sobre la condición clínica, el peso corporal y el hematocrito del modelo experimental murino.
- Monitorear posibles cambios en el calcio sérico con el tratamiento, a partir de la cuantificación de este ion interdiariamente por el método colorimétrico de la O-cresoltaleina complexona.
- Describir las alteraciones ultraestructurales producidas en células renales por efecto del pamidronato en infecciones experimentales por *T. evansi*, a partir de la técnica de microscopía electrónica de transmisión.
- Analizar estadísticamente las posibles diferencias entre los tratamientos con respecto a las variables de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Aislados “Teva 1” y “TeApEc-M” de *T. evansi*. Procedentes de *Equus caballus*. Las muestras originarias fueron obtenidas de un caballo infectado en forma natural en una localidad del Estado Apure. La sangre fue inoculada intraperitonealmente en ratones NMRI. Los tripanosomas de la sangre de los ratones fueron resuspendidos (1:1) en dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%, preparado en buffer fosfato salino glucosado y criopreservados en N₂ líquido para uso posterior.

Los ratones seleccionados fueron *M. musculus* (♀, 20 gr) de la cepa NMRI (bioterio IVIC). Estudios preliminares desarrollados por nosotros indican que esta cepa de roedores es idónea para el estudio del comportamiento parasitológico, inmunológico y morfométrico de *T. evansi* (Perrone y col., 2006).

Infecciones Experimentales

Las muestras de tripomastigotes, desde su aislamiento hasta la fecha de uso, permanecieron almacenadas en nitrógeno líquido a -170° C. Los hemoflagelados, una vez descongelados, fueron inoculados en ratas (Sprague Dawley, ♀, 20 gr).

Al lograr niveles parasitémicos del orden de 10⁴, los animales fueron desangrados por punción cardiaca, el fluido fue colectado y mezclado con EDTA. A partir de los tripomastigotes en anticoagulante se preparó una solución en buffer fosfato glucosado que, de acuerdo a las diluciones pertinentes, se inocularon intradérmicamente en los grupos experimentales (♀-NMRI). El inóculo utilizado fue de 100 tripomastigotes/gramo de peso ratón.

Los animales de experimentación permanecieron en jaulas *ad hoc*, provistas de agua y alimento. Se permitió que los roedores bebieran y comieran *ad libitum*. Los animales a tratar con pamidronato se inocularon intraperitoneal con dosis de 10 mg/Kg por peso corporal y la inyección se administró diariamente por 7 días, siendo la primera dosis 1 día post-infección.

Experimento *in vitro*

Los cultivos *in vitro* de *T. evansi* se llevarán a cabo a partir del protocolo descrito por Baltz y col. (1985). El medio de cultivo utilizado fue una modificación de medio mínimo esencial (MEM) a base de buffer Hepes y sales de Earle complementado con aminoácidos no esenciales (5,95 g), glucosa (1 g), bicarbonato de sodio (2.2 g), 0,2 mM 2-mercaptoetanol, 2 mM piruvato sódico, 0.1 mM hipoxantina, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina en agua bidestilada y 15% de suero bovino. La mezcla se esterilizó con presión positiva ($\phi = 0,22 \mu\text{m}$) (pH final = 7,3) (Baltz y col. 1995). El medio se almacenó a 4°C hasta su uso.

Los tripanosomas crecieron en platos de Petri (37°C; 5% CO₂). Una concentración de tripomastigotes de 1×10^7 flagelados/ml contenidos en 20 µl del buffer de elución (columna de DEAE-celulosa) se agregaron a 2 ml de medio de cultivo que se incorporó a cada uno de los platos de Petri con 3 ml de medio fresco. Un día después se añadieron 20 µl de un bisfosfonato en concentraciones ascendentes de 25 µM, 50 µM, 75 µM y 100 µM (Urbina y col. 1999). Se estimó la densidad poblacional a 400X (Brenner 1962) cada 24 h hasta completarse las 72 h de cultivo.

Diseño Experimental

Se emplearon 4 grupos con sus respectivos duplicados para comprobar la reproducibilidad de los resultados. Las condiciones experimentales pueden observarse en la Figura 9.

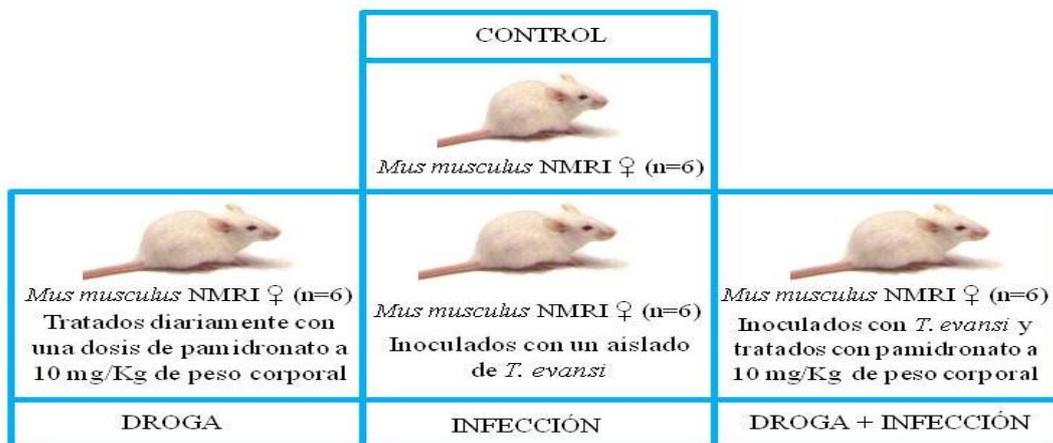


Figura 9. Condiciones experimentales (Cortesía de Andrade R.)

Para evaluar el estado de animal durante la infección y a causa de droga administrada, se monitoreo interdiariamente el peso del animal, el hematocrito y la parasitemia. A intervalos de tiempo regulares se sacrificó un ratón de cada grupo a partir de dislocación cervical y mediante ablación quirúrgica se extrajo el riñón. Este órgano se procesó para su observación, registro y análisis por la técnica de microscopia electrónica de transmisión Además se tomaron muestras de sangre para ser procesadas bioquímicamente, obteniéndose así la cuantificación del calcio sérico. Finalmente se analizaron estadísticamente los datos resultantes para comprobar las posibles diferencias existentes entre los tratamientos (Figura 10).

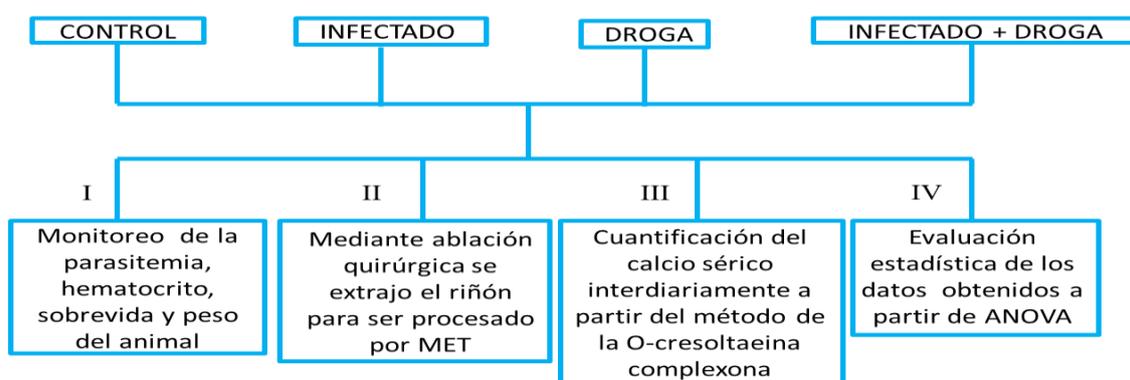


Figura 10. Procesamiento de muestra y análisis de datos (Cortesía de Andrade R.)

Registro del peso de los ratones

Los ratones pertenecientes a cada grupo experimental fueron colocados en una balanza para estimar su peso corporal y, posteriormente, se procedió con las pruebas pertinentes.

Procesamiento de la sangre colectada

La sangre fue extraída a partir de la vena caudal mediante un corte en el extremo de la cola del ratón. La sangre colectada fue utilizada del siguiente modo:

- 5µl se emplearon para estimar, por conteo en fresco, el número de tripomastigotes/ml de sangre (Brener, 1962).
- 40 µl fueron utilizados para determinar valores de hematocrito; posteriormente fue separado el plasma para realizar determinaciones de calcio sérico en la sangre de los roedores.

Cuantificación de la parasitemia

El método usado para la cuantificación de parásitos, es una adaptación del método original de Brener (1962), en el cual se colocan 5 µl de sangre en un porta-objetos, sobre la muestra de sangre se dispone una laminilla cubre-objetos (22mm x 22mm) y se presiona suavemente para que la muestra se distribuya homogéneamente bajo la superficie del cubre-objetos. La muestra se lleva al microscopio, donde son observados 100 campos a 400X.

La fórmula que permite la evaluación de la parasitemia es la siguiente:

$$\frac{\text{Flagelados}}{\text{ml}} = Oc \times Fm \times Fd$$

Oc, representa el número de organismos contados, *Fm*, es el factor del microscopio y *Fd*, es el factor de dilución. *Fm*, es un valor constante que, por depender de las propiedades de fabricación de la óptica del instrumento utilizado, es diferente para cada microscopio. Para calcularlo, las magnitudes correspondientes a las áreas del cubreobjetos y de un campo microscópico (400X) se dividen. Considerando que el método original fue diseñado para 5mm y que se utilizaron 5µl, el valor proveniente del cociente de las áreas se divide entre 0.05 y para que el resultado final se exprese en ml, el cociente obtenido se divide entre 10.

Cuantificación del calcio sérico

Para la cuantificación del calcio en suero se utilizó un estuche comercial (Laboratorios Heiga C.A.) que tiene como principio el método colorimétrico de la O-cresoltaleina complexona propuesto originalmente por Schwarzenbach (1955). Este consiste en la formación de un complejo violeta al hacer reaccionar iones calcio y o-cresoltaleina complexona en medio alcalino. Para realizar las mediciones se tomaron 5 µl de suero y 5µl de una muestra patrón de calcio de concentración conocida y se disolvieron en 0,5 mL de reactivo o-cresoltaleina complexona. Luego se realizaron mediciones en un espectrofotómetro convencional a 575 nm, las soluciones patrón y las muestras de suero tienen un pico máximo de absorción único a esta longitud de onda.

Microscopía electrónica de transmisión

La técnica de corte fino consta de los pasos de fijación, deshidratación, infiltración, inclusión, corte y contrastación.

Fijación

La fijación se realiza con la finalidad de conservar las células y tejidos en un estado similar, en morfología y composición química, al estado vivo. Para esto, una de las cualidades que debe tener un fijador es la rapidez; las células se deben matar y fijar antes de que aparezcan los fenómenos autolíticos. Además, el fijador debe poseer alto poder de penetración para asegurar la fijación correcta hasta en las capas más profundas del tejido a ser preservado, conservando en lo posible, los detalles que presentaban *in vivo*.

Como primer fijador se emplea el glutaraldehído al 3% en buffer fosfato de Millonig (1961), siendo el pH de 7,4 y la osmolaridad 320 mOsm. Se emplea una osmolaridad mayor que la del plasma de los mamíferos, por cuanto en el rango utilizado no se advierte daño tisular, y además, se evita que la solución fijadora que alcanza las regiones centrales de la muestra esté muy diluida. No se incluye en la osmolaridad total, la contribución del glutaraldehído, ya que no constituye factor importante en la presión osmótica efectiva (Arborgh y col., 1976).

El glutaraldehído como agente fijador tiene como finalidad establecer puentes de entrecruzamiento con las proteínas. Se enlaza a los grupos amino de las proteínas. Específicamente, el grupo aldehído reacciona con el grupo amino de la lisina ubicada en proteínas adyacentes originando así los puentes de entrecruzamiento (Bozzola y Russell, 1992).

Una vez extraída las muestras de riñón esta se sujetó a una superficie de corcho en donde se fijará por 5 minutos, luego se corta el tejido en trocitos de unos 2 mm³ continuándose la fijación en frasquitos de 10ml hasta completar los 45 minutos requeridos. Al cabo de ese tiempo, las muestras se lavarán en buffer fosfato por 5 minutos y se postfijarán en tetraóxido de osmio al 1% en el mismo buffer y bajo las mismas condiciones de osmolaridad y pH. La postfijación se prolonga durante 1 hora,

prosiguiendo con un lavado de 15 minutos en agua destilada. El postfijador reacciona con las moléculas lipídicas de la membrana plasmática.

El uso de agua destilada para lavar el material luego de la fijación en OsO_4 se justifica por cuanto la técnica de corte fino incluye un paso de contrastación con acetato de uranilo al 3% en agua, siendo bien sabido que el $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ reacciona con los grupos fosfatos (Ginsburg y Wolosin, 1979; Ting-Beall, 1979).

Deshidratación

La deshidratación es un proceso de sustitución del agua intracelular por un líquido que actúa a modo de solvente entre el medio celular acuoso y la resina de inclusión. Se utilizó etanol como agente deshidratante, siguiendo el protocolo:

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

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

Infiltración

Puesto que el etanol es poco soluble en la resina epóxica, la infiltración logra, mediante un compuesto intermedio entre el etanol y el epón, tal miscibilidad. Los pasos a seguidos fueron:

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

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

Inclusión

El proceso de inclusión, consiste en la sustitución de la mezcla óxido de propileno-epón por la mezcla de la resina que polimeriza bajo condiciones particulares. La inclusión de la muestra en un soporte sólido permite obtener cortes finos. Antes de la inclusión, se efectuaron 4 cambios en resina de 30 minutos cada uno (Luft, 1961). La resina consta de los siguientes componentes:

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

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

Corte y contraste

Los cortes ultrafinos (60–90 nm) fueron obtenidos con cuchilla de diamante acoplada a un ultramicrotomo Porter–Blum MT2–B (Figura 9). Las secciones finas se contrastaron con acetato de uranilo (Watson,1958) y citrato de plomo (Reynolds, 1963).

El modo de acción de estos contrastantes no se conoce con exactitud. No obstante, se acepta que los iones uranilo reaccionan fuertemente con los grupos amino y fosfato contenidos en los ácidos nucleicos y las proteínas, las cuales se tiñen de modo importante. Asimismo, los iones plomo se enlazan a componentes cargados negativamente, tales como los grupos hidroxilo, así como a las áreas en las que previamente se había enlazado el osmio. Los grupos fosfatos también podrían estar implicados en este proceso

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

El contraste con citrato de plomo se efectuó colocando una gota de la solución sobre “parafilm” en una placa de Petri. Es importante destacar que la placa

debe estar completamente anhidra. Para lograrlo se le colocarán perlititas de NaOH durante los 20 minutos previos a la introducción de las rejillas. Luego de 15 minutos en contacto con el contrastante, los cortes se enjuagarán vigorosamente con agua destilada y se dejarán secar.

Los cortes se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011, con voltaje de aceleración de 80 kV (Figura 11). El registro permanente se efectuó en negativos de $8,3 \times 10,2$ cm.

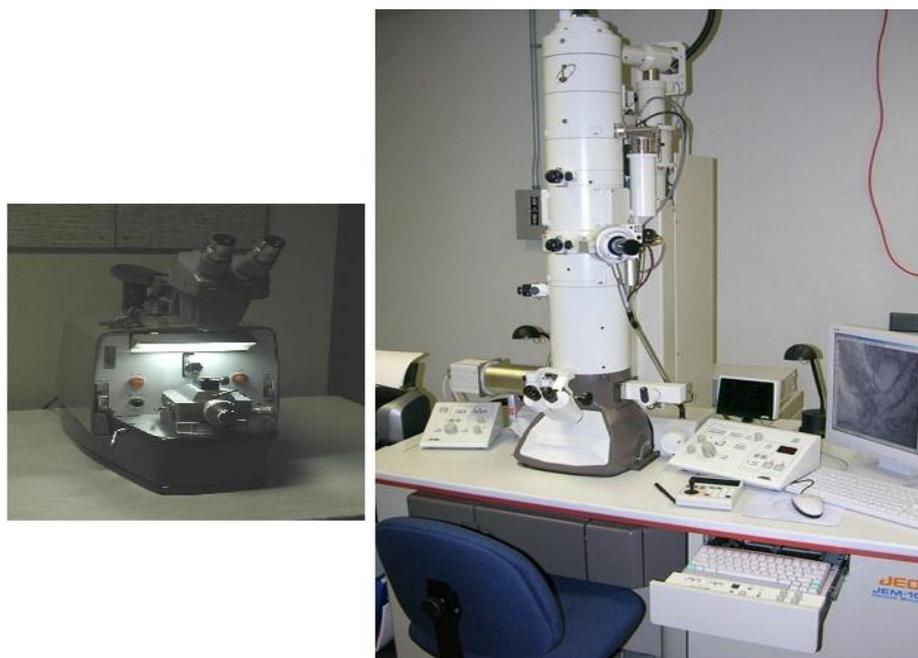


Figura 11. Ultramicrotomo Porter-Blum MT-2 (izquierda) y microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011 (derecha)

Manejo numérico de los resultados

Análisis de la Varianza (ANOVA)

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

Esta técnica fue indispensable para determinar y comprobar si existen cambios significativos en las variables estudiadas con respecto a los tratamientos en estudio.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio se presentan agrupados en 4 secciones: I. Efecto del pamidronato en cultivos *in vitro* de *T. evansi*, II. Determinación de la concentración de pamidronato a utilizar en el ensayo *in vivo*, III. Evaluación del pamidronato en infecciones experimentales murinas por *T. evansi* y IV. Efecto del pamidronato sobre el modelo experimental murino

I. Efecto del pamidronato en cultivos *in vitro* de *T. evansi*

Con la finalidad de evaluar la actividad tripanocida del pamidronato sobre *T. evansi*, se procedió a aplicar concentraciones crecientes de pamidronato (25, 50, 75 y 100 μM) en cultivos *in vitro* con los aislados “Mantecal” y “Teval”. El aislado “El Mantecal” no proliferó en el medio modificado que fue utilizado. Por otro lado, el cultivo del aislado “Teval” proliferó exponencialmente, pudiéndose observar como el grupo control creció progresivamente desde el inicio del cultivo hasta las 48 horas aproximadamente, donde comenzó a decrecer hasta a cero flagelados por mL (Ver Figura 12).

En el caso de los cultivos con los tratamientos de 25, 50 y 75 μM se pudo evidenciar una disminución progresiva en la carga parasitaria a partir de las 24h (hora de inicio de la aplicación de la droga) que llega hasta cero en las 72h. Por su parte, el tratamiento con la concentración más alta de droga (100 μM) mostró un decremento hasta cero flagelados por mL apenas a las 48h (Ver Figura 12). La Tabla 1 certifica la significancia estadística ($p < 0.05$) de estos resultados.

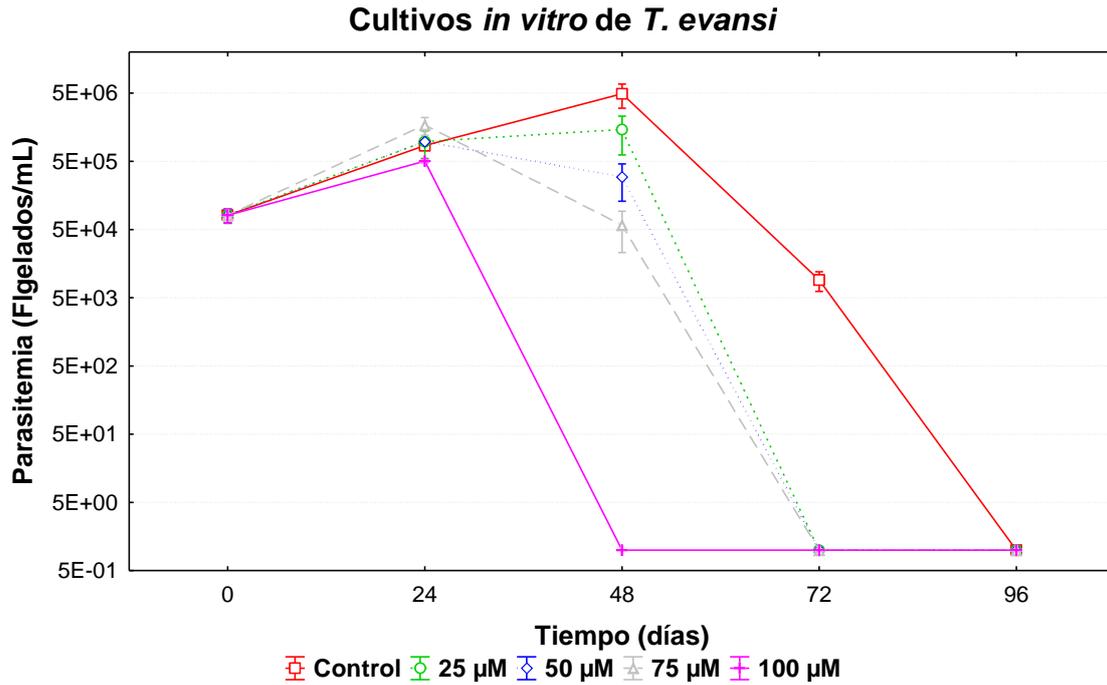


Figura 12. Curso temporal de la parasitemia en cultivos *in vitro* de *T. evansi*. Se muestran los resultados obtenidos en cultivo del grupo control infección (Control; cuadrado) y los grupos que recibieron tratamiento con Pamidronato (25 µM; círculo, 50 µM; rombo, 75 µM; triángulo y 100 µM; cruz). Las líneas muestran el curso promedio diario de la parasitemia y las barras (ó bigotes) indican el error estándar asociado a la media aritmética.

Tabla 1. Cuadro obtenido a partir del cálculo de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 2-Factores ($\alpha=0.05$) realizado a las parasitemias de las diferentes replicas en los cultivos *in vitro*. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p<0.05$) para las variables tiempo de cultivo (Factor 1) y tratamiento (Factor 2)

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tiempo	1,503727E+13	4	3,759317E+12	7,86779	0,000558
Tratamiento	5,513076E+12	4	1,378269E+12	2,88455	0,048998
Tiempo*Tratamiento	2,860465E+13	16	1,787791E+12	3,74162	0,003143
Error	9,556227E+12	20	4,778113E+11		

II. Determinación de la concentración de pamidronato a utilizar en el ensayo *in vivo*

Con el objetivo de determinar la concentración de pamidronato más adecuada para utilizar en las infecciones experimentales, se procedió a evaluar el porcentaje de sobrevida en murinos sanos tratados con concentraciones creciente de pamidronato, 7,5 y 10 mg/Kg una vez al día y 5 y 10 mg/Kg dos veces diarias.

En la Figura 13 se muestran las curvas de sobrevida para las diferentes concentraciones de pamidronato evaluadas. Los grupos que recibieron 7,5 y 10 mg/Kg una vez al día mostraron un porcentaje de sobrevida de 100%, durante el periodo de observación (30 días). En cambio, en los grupos con tratamientos de 7,5 y 10 mg/Kg dos veces diarias, exhibieron una disminución en el porcentaje de sobrevida hasta de un 0%. Un Análisis de la Varianza (ANOVA) factorial confirma un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$; Tabla 2) en las variables tratamiento y el tiempo para este ensayo.

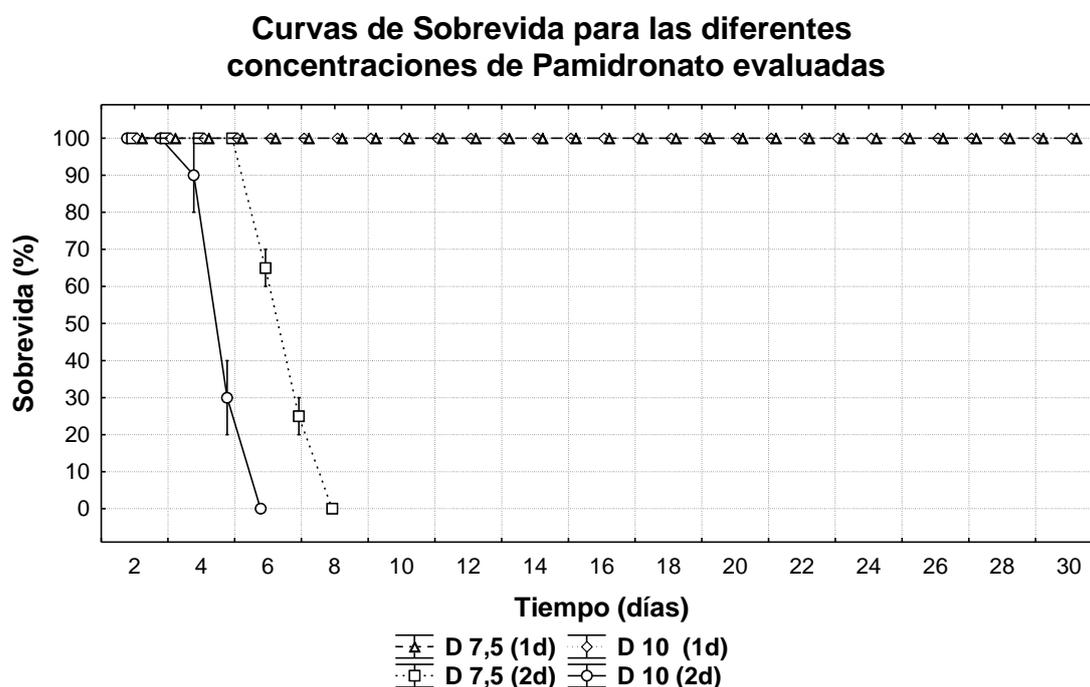


Figura 13. Evaluación de la dosis de pamidronato en modelo murino. Se muestra la sobrevida de los animales tratados durante 7 días, con dosis de 7,5 mg/Kg (triángulo) y 10 mg/Kg (rombo) una vez al día y de 7,5 mg/Kg (cuadrado) y 10 mg/Kg (círculo) dos veces diarias. Las líneas muestran el curso promedio diario de la sobrevida y las barras (ó bigotes) indican el error estándar asociado a la media aritmética.

Tabla 2. Cuadro obtenido a partir del cálculo de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 2-Factores ($\alpha=0.05$) realizado a las curvas de supervivencia de las diferentes concentraciones de pamidronato evaluadas. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p<0.05$) para las variables Tiempo (Factor 1) y Tratamiento (Factor 2).

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tiempo	30150,7	28	1076,8	8,614	0,024268
Tratamiento	218938,0	3	72979,3	583,835	0,000010
Tiempo*Tratamiento	35682,6	84	424,8	3,398	0,119060
Error	500,0	4	125,0		

III. Evaluación del pamidronato en infecciones experimentales murinas por *T. evansi*.

Se realizaron tratamientos por 7 días con dosis diarias de pamidronato a 10 mg/Kg en murinos infectados experimentalmente con dos aislados de *T. evansi* “Teval” y “Mantecal”, esto con el propósito de evaluar el efecto de este fármaco sobre el parásito en un modelo *in vivo*.

IIIa. Sobrevida

En la Figura 14, se presentan las curvas de sobrevida de los roedores infectados con el aislado “Teval” y del grupo de murinos infectados con tratamiento. Se puede observar como la sobrevida disminuye significativamente en el tiempo ($p < 0.05$, Tabla 3) a partir de 4 días post-infección, tanto en el grupo infectado como en el grupo infectado más tratamiento. Por otro lado, es importante resaltar que la disminución en el porcentaje de sobrevida fue muy similar entre los tratamientos evaluados, ($p > 0.05$, Tabla 3).

Los grupos infectados con el aislado “Mantecal” (tratados y no tratados) mostraron una disminución en el porcentaje de sobrevida hasta el 0 %, sin embargo, estos grupos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p < 0.05$, Tabla 4). El grupo infección sin tratamiento exhibió una disminución en el porcentaje de sobrevida desde el día 13 hasta el día 18 post-infección. Por su parte, el grupo infectado más tratamiento mostró una disminución tardía en el porcentaje de sobrevida con respecto al grupo infección, ya que, la disminución en el porcentaje de sobrevida comenzó a partir del día 23 y continuo hasta el día 28 post-infección (Ver Figura 15). La tabla 4 muestra como las disimilitudes entre estos tratamientos son estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

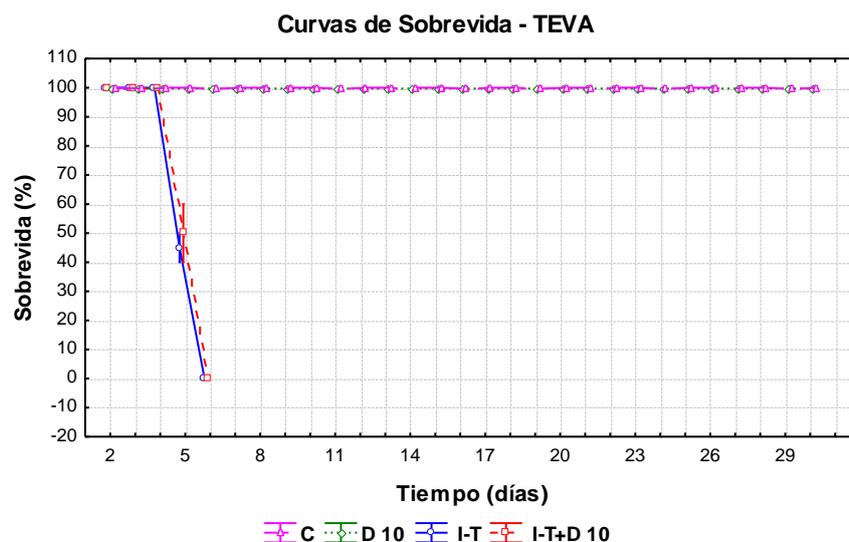


Figura 14. Evaluación del tratamiento con pamidronato sobre la sobrevida de murinos infectados experimentales con el aislado “Teva1”. Se puede observar el curso temporal de la sobrevida en los grupos control (C; triangulo), droga 10mg/Kg (D 10; rombo), infectado con el aislado “Teva1” (I-T; circulo) e infectado más tratamiento con dosis diarias de droga a 10mg/Kg (I-T+D 10; cuadrado). Las líneas muestran el curso promedio interdiario de la sobrevida y las barras (ó bigotes) indican el error estándar asociado a la media aritmética.

Tabla 3. Cuadro obtenido a partir del cálculo de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 2-Factores ($\alpha=0.05$) realizado a las curvas de sobrevida de las infecciones experimentales por “Teva1”. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) en la variable Tiempo (Factor 1) y exhibió disimilitudes significativas ($p<0.05$) para la variable Tratamiento (Factor 2).

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tiempo	11,11	1	11,11	0,222	0,683772
Tratamiento	16666,67	4	4166,67	83,333	0,011893
Tiempo*Tratamiento	66,67	4	16,67	0,333	0,840000
Error	100,00	2	50,00		

Curvas de Sobrevida - Mantecal

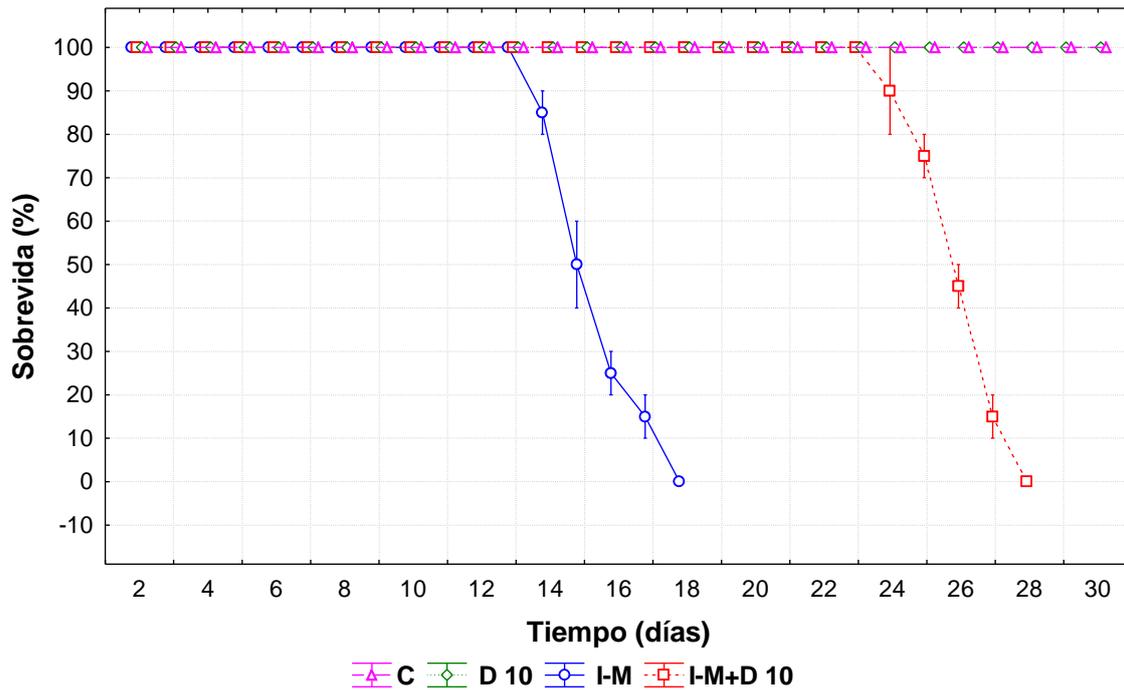


Figura 15. Evaluación del tratamiento con pamidronato sobre la sobrevida de murinos infectados experimentales con el aislado “Mantecal”. Se muestra la sobrevida de los grupos control (C; triangulo), droga 10mg/Kg (D 10; rombo), infectado con el aislado “Mantecal” (I-M; circulo) e Infectado mas tratamiento con dosis diarias de droga a 10mg/Kg (I-M+D 10; cuadrado) en el transcurso del tiempo de experimentación. Las líneas muestran el curso promedio diario de la sobrevida y las barras (ó bigotes) indican el error estándar asociado a la media aritmética.

Tabla 4. Cuadro obtenido a partir del cálculo de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 2-Factores ($\alpha=0.05$) realizado a las curvas de sobrevida de las infecciones experimentales por “Mantecal”. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p<0.05$) para las variables Tiempo (Factor 1) y Tratamiento (Factor 2).

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tiempo	37568,9	28	1341,7	19,17	0,000014
Tratamiento	56837,9	3	18946,0	270,66	0,000000
Tiempo*Tratamiento	69072,7	84	822,3	11,75	0,000099
Error	700,0	10	70,0		

IIIb. Parasitemia

Se evaluó el efecto del tratamiento con pamidronato sobre el curso de las parasitemias experimentales. En los grupos infectados (tratados y no tratados) con el aislado “Teva1” se pudo notar un incremento continuo en la carga parasitaria hasta la muerte de los ratones. El grupo infectado sin tratamiento mostró carga parasitaria desde el día 3 post-infección, mientras que el grupo tratado (I-T+D 10) no mostró ningún flagelado en el día 3 post-infección (Ver Figura 16). No obstante, el Análisis de Varianza realizado demuestra que no existen diferencias significativas entre las parasitemias de los grupos evaluados con respecto a las variables tiempo y tratamiento ($p>0.05$; Tabla 5).

Las infecciones experimentales con el aislado “Mantecal” (Ver Figura 17) presentaron notables disimilitudes entre los grupos experimentales. El grupo infectado (I-M) mostró un incremento en la carga parasitaria a partir del día 4 post-infección generándose la muerte del último individuo al día 17. En cambio, el grupo infectado más droga (I-M+D 10) mostró una aparición de flagelados desde el día 9 post-infección, teniéndose un incremento continuo de la parasitemia a partir del día 11 post-infección y presentándose la muerte de todos los murinos después de 27 días de haber comenzado la experimentación. En la Tabla 6 se puede apreciar como un Análisis de la Varianza de 2 factores confirma que las diferencias obtenidas en la variable tiempo entre estos grupos son estadísticamente significativa.

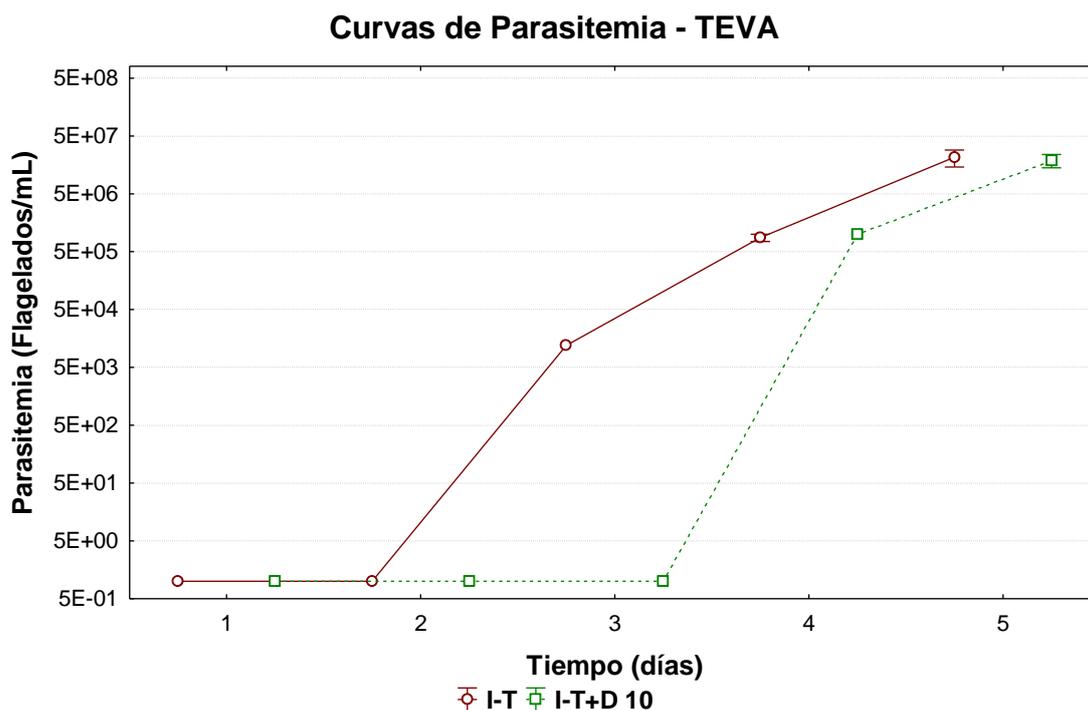


Figura 16. Evaluación del efecto del pamidronato sobre la parasitemia en infecciones experimentales murinas con el aislado “Teva1”. Se muestra la parasitemia de los grupos infectado con el aislado “Teva1” (I-T; círculo) e Infectado más tratamiento con dosis diarias de droga a 10mg/Kg (I-T+D 10; cuadrado). Las líneas muestran el curso promedio diario de las parasitemias y las barras (ó bigotes) indican el error estándar asociado a la media aritmética.

Tabla 5. Cuadro obtenido a partir del cálculo de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 2-Factores ($\alpha=0.05$) realizado a las parasitemias de las infecciones experimentales por “Teva1”. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p>0.05$) para las variables Tiempo (Factor 1) y Tratamiento (Factor 2).

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tiempo	1,658992E+15	4	4,147480E+14	3,302767	0,080387
Tratamiento	7,122205E+11	1	7,122205E+11	0,005672	0,942075
Tiempo*Tratamiento	6,694655E+12	4	1,673664E+12	0,013328	0,999556
Error	8,790313E+14	7	1,255759E+14		

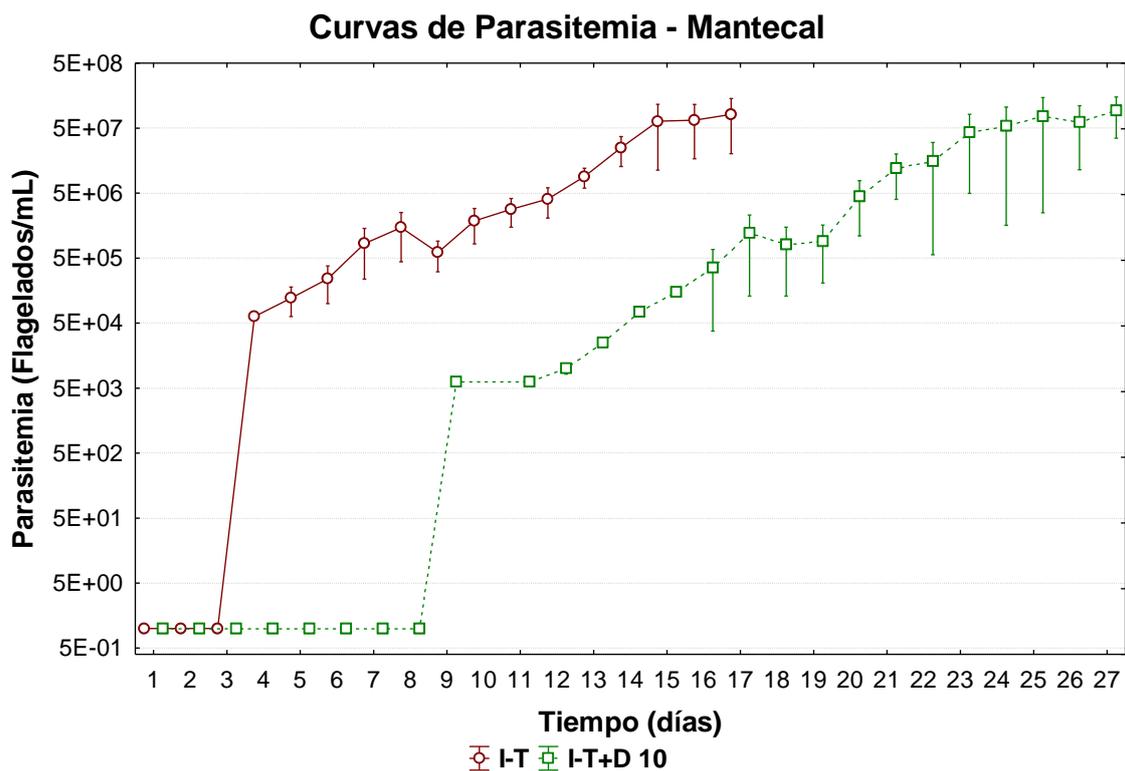


Figura 17. Evaluación del efecto del pamidronato sobre la parasitemia en infecciones experimentales murinas con el aislado “Mantecal”. Se puede observar la parasitemia de los grupos infectado con el aislado “Mantecal” (I-M; círculo) e Infectado más tratamiento con dosis diarias de droga a 10mg/Kg (I-M+D 10; cuadrado). Las líneas muestran el curso promedio diario de la sobrevida y las barras (ó bigotes) indican el error estándar asociado a la media aritmética.

Tabla 6. Cuadro obtenido a partir del cálculo de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 2-Factores ($\alpha=0.05$) realizado a las parasitemias de las infecciones experimentales por “Mantecal”. El análisis estadístico exhibió disimilitudes significativas ($p<0.05$) para la variable Tiempo (Factor 1) y no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) para la variable Tratamiento (Factor 2).

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tiempo	2,812473E+15	1	2,812473E+15	0,727452	0,039934
Tratamiento	1,402572E+16	16	8,766077E+14	0,226737	0,998721
Tiempo*Tratamiento	1,348950E+16	16	8,430938E+14	0,218068	0,998987
Error	1,391830E+17	36	3,866195E+15		

IV. Efecto del pamidronato sobre el modelo experimental murino.

Los parámetros clínicos y patológicos evaluados en esta investigación también fueron de suma importancia para la comprensión de la afección generada en el roedor a causa del tratamiento.

IVa. Condición clínica

Los murinos tratados con dosis diarias de pamidronato a 7,5 y 10 mg/Kg mostraron una condición clínica aparentemente óptima durante y después de haber finalizado el tratamiento. En el caso de los murinos con tratamientos de pamidronato a 7.5 mg/Kg y 10 mg/Kg dos veces diarias pudieron evidenciarse reacciones adversas claramente notables en la condición clínica de los roedores. Estos grupos de murinos mostraron como síntoma principal una pérdida notable de pelaje (alopecia) fundamentalmente en la región abdominal, el lomo y el cuello. Además se pudo apreciar una leve dilatación en la mucosa vaginal y una importante irritación en la mucosa ocular de los murinos (Ver Figura 18).

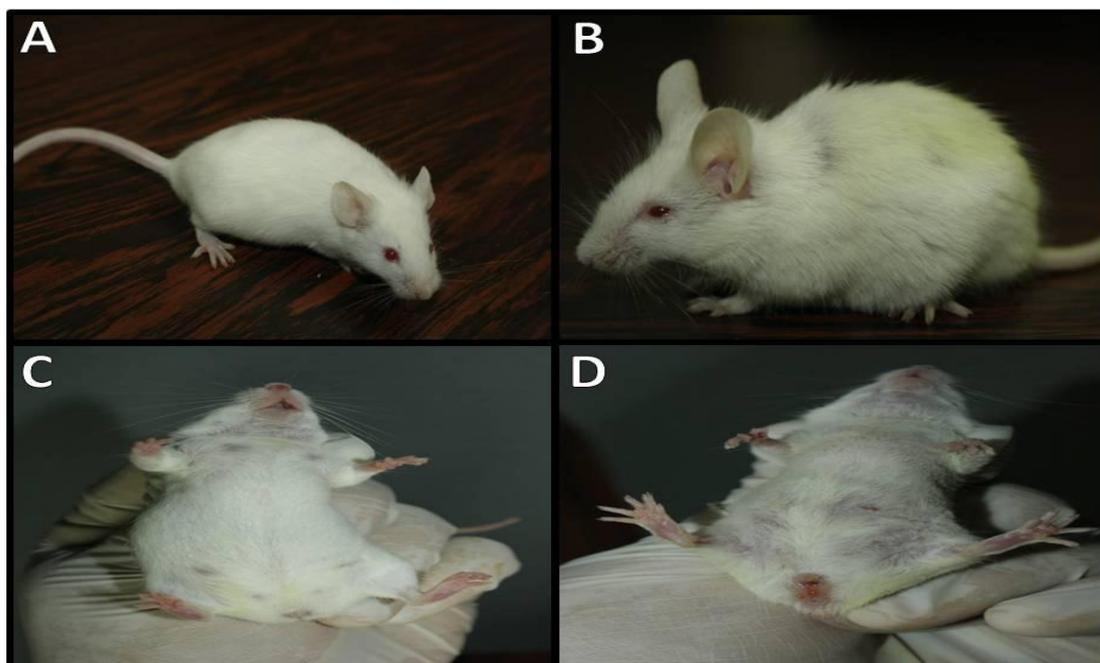


Figura 18. Evaluación de la dosis de pamidronato en la condición clínica del modelo experimental murino. A la izquierda (A y C) se presenta a un murino en condiciones clínicas óptimas y a la derecha (B y D) se puede apreciar la condición clínica característica de un individuo tratado con 10 mg/Kg dos veces diarias luego de 3 días de tratamiento (Tomadas por Pedro Cabello).

IVb. Peso corporal

Se analizó el comportamiento de la variable clínica peso en infecciones experimentales murinas por *T. evansi* con los aislados “Teval1” y “Mantecal”.

La Figura 19 muestra como los animales infectados por “Teval1” e infectados más tratamiento disminuyeron su peso progresivamente, siendo más notable esta tendencia en el día 5 post-infección. El grupo tratado con 10 mg/Kg de pamidronato no disminuyó su peso, sin embargo, el incremento de peso obtenido por este grupo no fue comparable al obtenido por el grupo control quien presentó un incremento de peso significativamente mayor (Tabla 7; $p < 0.05$).

En las infecciones experimentales por “Mantecal” los grupos infectado (I-M) e infectado más droga (I-M+D 10) también disminuyeron su peso progresivamente. A pesar de esto, el grupo tratado mostró una disminución menos pronunciada y que se extiende hasta el día 27 post infección, cuando el grupo infectado disminuyó progresivamente su peso los últimos 5 días de infección hasta el día 17 post-infección (Ver Figura 20). En el caso del grupo no infectado y tratado con 10 mg/Kg de droga (D 10) no se observó una disminución de peso, no obstante, se pudo notar un incremento paulatino en esta variable no comparable al obtenido en el grupo control (C). El Análisis de la Varianza que se muestra en la Tabla 8, certifica estadísticamente las disimilitudes obtenidas en la variable peso para los diferentes grupos en estudio.

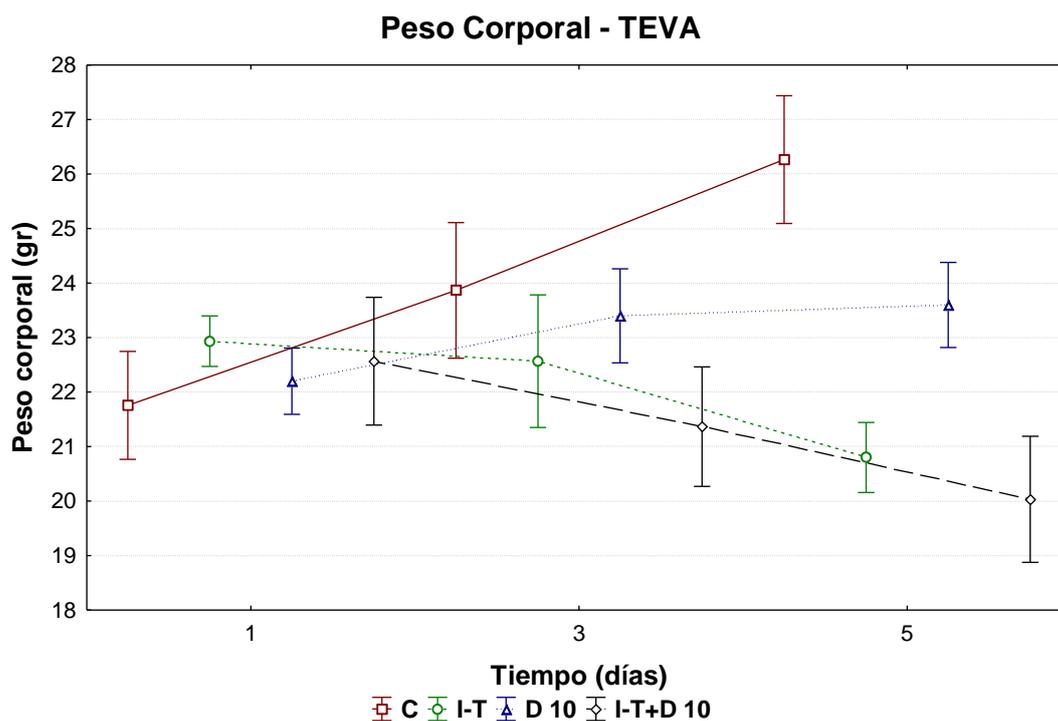


Figura 19. La gráfica muestra la variación temporal del peso corporal en infecciones experimentales murinas con el aislado “Teva1”. Se puede notar la variación del peso corporal en los grupos control (C; cuadrado), droga 10mg/Kg (D 10; triangulo), infectado con el aislado “Teva1” (I-M; círculo) e Infectado más tratamiento con dosis diarias de droga a 10mg/Kg (I-M+D 10; rombo). Las líneas muestran el curso promedio interdiario del peso, donde cada muestra presenta una media aritmética y su error estándar asociado.

Tabla 7. Cuadro obtenido a partir del cálculo de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 2-Factores ($\alpha=0.05$) realizado al peso corporal de los murinos en las infecciones experimentales por “Teva1”. El análisis estadístico exhibió disimilitudes significativas ($p<0.05$) para la variable Tiempo (Factor 1) y no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) para la variable Tratamiento (Factor 2).

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tiempo	47,45	3	15,82	3,329	0,036457
Tratamiento	2,08	2	1,04	0,219	0,804943
Tiempo*Tratamiento	48,09	6	8,01	1,687	0,167463
Error	114,02	24	4,75		

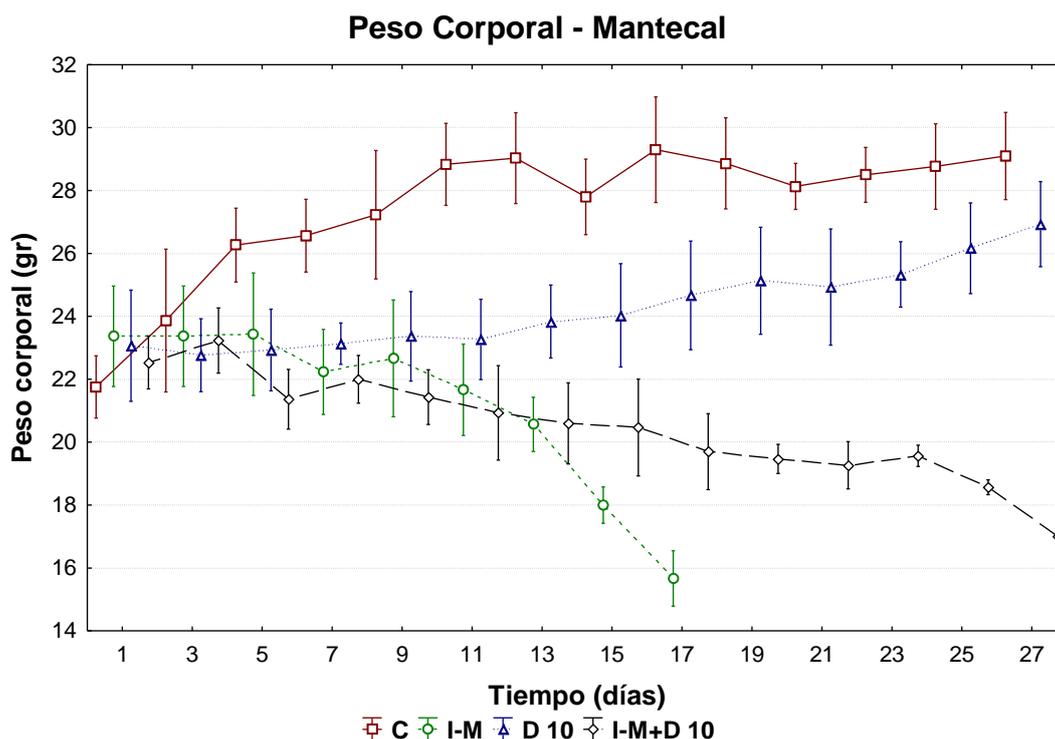


Figura 20. Se muestra la variación en el tiempo del peso corporal en infecciones experimentales murinas con el aislado “Mantecal”. Se puede observar la variación del peso corporal en los grupos control (C; cuadrado), droga 10mg/Kg (D 10; triángulo), infectado con el aislado “Mantecal” (I-M; círculo) e Infectado más tratamiento con dosis diarias de droga a 10mg/Kg (I-M+D 10; rombo). Las líneas muestran el curso promedio del peso durante el periodo de experimentación. Cada muestra presenta una media aritmética y su error estándar asociado.

Tabla 8. Cuadro obtenido a partir del cálculo de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 2-Factores ($\alpha=0.05$) realizado al peso corporal de los murinos en las infecciones experimentales por “Mantecal”. El análisis estadístico exhibió diferencias significativas ($p<0.05$) para la variable Tiempo (Factor 1) y no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) para la variable Tratamiento (Factor 2).

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tiempo	556,01	3	185,34	24,184	0,000000
Tratamiento	37,56	8	4,70	0,613	0,764395
Tiempo*Tratamiento	326,31	24	13,60	1,774	0,032830
Error	551,77	72	7,66		

IVc. Hematocrito

Se monitoreó la variable hematocrito en los murinos durante en las infecciones experimentales, esta variable podría ser de importancia para conocer la condición clínica del animal.

En la Figura 21 se muestra el comportamiento de la variable hematocrito en infecciones experimentales por el aislado “Teva1”. Las disimilitudes entre tratamientos puede apreciarse mejor en el día 5 post-infección, en el cual existe una disminución significativa en el porcentaje de hematocrito en los grupos infectados e infectados más tratamiento ($p < 0.05$, Tabla 9). El grupo droga 10 mg/Kg también muestra una disminución apreciable en el hematocrito con respecto al grupo control, sin embargo, este decremento es mucho menos pronunciado que los mostrados por los murinos infectados.

En los grupos de las infecciones experimentales por el aislado “Mantecal” la variable porcentaje de hematocrito mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$, Tabla 10). El grupo infección presentó una disminución progresiva en esta variable, siendo este decremento mucho más pronunciado en los últimos 5 días de la infección. El grupo infectado más tratamiento exhibió valores de hematocrito levemente disminuidos durante los primeros 19 días de experimentación, posteriormente con la aparición de altas parasitemias se presentó una disminución drástica del hematocrito hasta la muerte de los murinos (día 28 post-infección). Por su parte, el grupo tratado sin infección (droga 10mg/Kg) mostró valores de hematocrito muy similares al grupo control durante el tratamiento (Ver Figura 22).

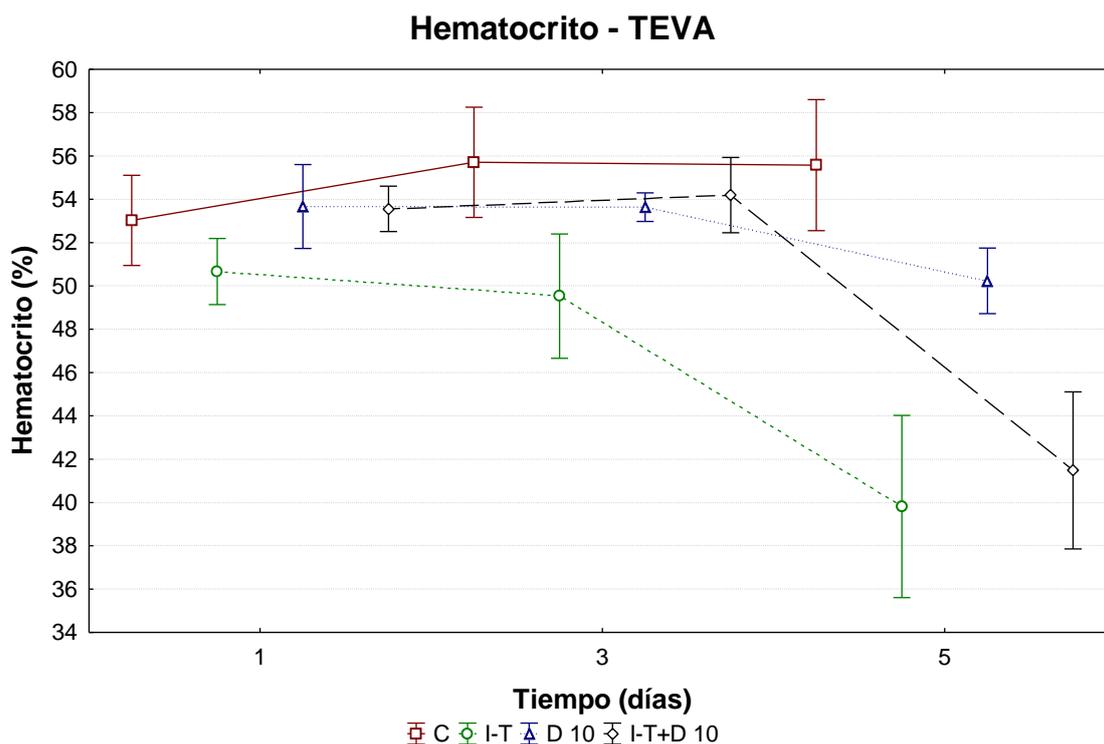


Figura 21. La gráfica muestra la variación temporal del hematocrito en infecciones experimentales murinas con el aislado “Teva1”. Se puede observar la variación del hematocrito en los grupos control (C; cuadrado), droga 10mg/Kg (D 10; triangulo), infectado con el aislado “Teva1” (I-T; circulo) e Infectado más tratamiento con dosis diarias de droga a 10mg/Kg (I-T+D 10; rombo). Las líneas muestran el curso promedio interdiario del hematocrito, donde cada muestra presenta una media aritmética y su error estándar asociado.

Tabla 9. Cuadro obtenido a partir del cálculo de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 2-Factores ($\alpha=0.05$) realizado al hematocrito de los murinos en las infecciones experimentales por “Teva1”. El análisis estadístico exhibió diferencias significativas ($p<0.05$) para las variables Tiempo (Factor 1) y Tratamiento (Factor 2).

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tiempo	516,6	3	172,2	10,041	0,000046
Tratamiento	372,5	4	93,1	5,431	0,001373
Tiempo*Tratamiento	252,4	12	21,0	1,227	0,299478
Error	686,0	40	17,1		

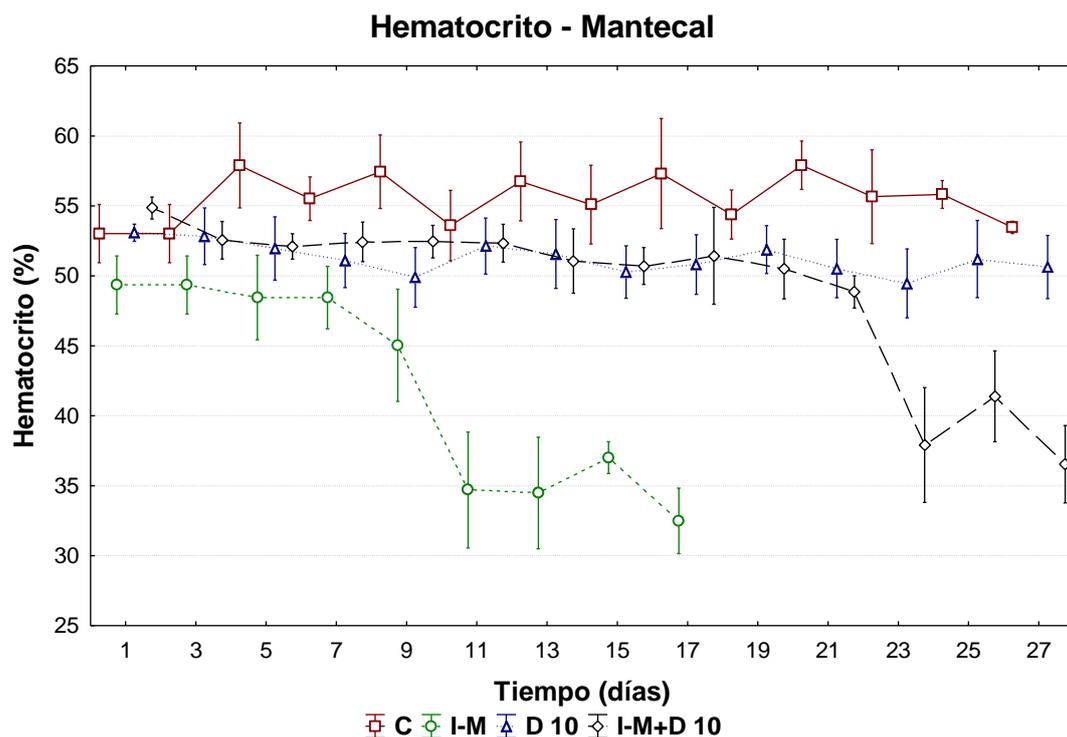


Figura 22. Se muestra la variación en el tiempo del hematocrito en infecciones experimentales murinas con el aislado “Mantecal”. Se aprecia la variación del hematocrito en los grupos control (C; cuadrado), droga 10mg/Kg (D 10; triangulo), infectado con el aislado “Mantecal” (I-M; circulo) e Infectado más tratamiento con dosis diarias de droga a 10mg/Kg (I-M+D 10; rombo). Las líneas muestran el curso promedio del hematocrito durante el periodo de experimentación. Cada muestra presenta una media aritmética y su error estándar asociado.

Tabla 10. Cuadro obtenido a partir del cálculo de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 2-Factores ($\alpha= 0.05$) realizado al hematocrito de los murinos en las infecciones experimentales por “Mantecal”. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p<0.05$) para las variables Tiempo (Factor 1) y Tratamiento (Factor 2).

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tiempo	950,895	2	475,4477	26,71699	0,000000
Tratamiento	871,723	8	108,9654	6,12313	0,000002
Tiempo*Tratamiento	1932,485	34	56,8378	3,19390	0,000003
Error	1815,162	102	17,7957		

IVd. Calcio Sérico

La concentración de calcio en suero de los individuos con tratamientos por pamidronato puede verse modificado a causa de la relación de este fármaco en el proceso de resorción ósea. Además, el posible uso de calcio por parte del parásito en su metabolismo puede contribuir también en esta tendencia. Por esto, la evaluación de la concentración de calcio en los tratamientos es de suma importancia para la comprensión la condición clínica de los individuos en estudio.

Las Figura 23 y 24 muestra como los grupos tratados con pamidronato y los grupos infectados experimentalmente con los aislados “Teva1” y “Mantecal” exhiben una disminución significativa en la concentración de calcio ($p < 0.05$, Tabla 11 y 12). En el grupo infección se puede apreciar como existe una disminución de la variable concentración de calcio en el transcurso del tiempo; este decremento se acentúa con el incremento de la parasitemia. El grupo tratado con 10 mg/Kg sin infección muestra una disminución pronunciada en la concentración de calcio pocos días después de haber iniciado el tratamiento. Esta variable presenta un incremento significativo después de finalizar el tratamiento. El grupo infección más tratamiento también presentó una disminución de la concentración de calcio que se mantiene durante todo el periodo de experimentación.

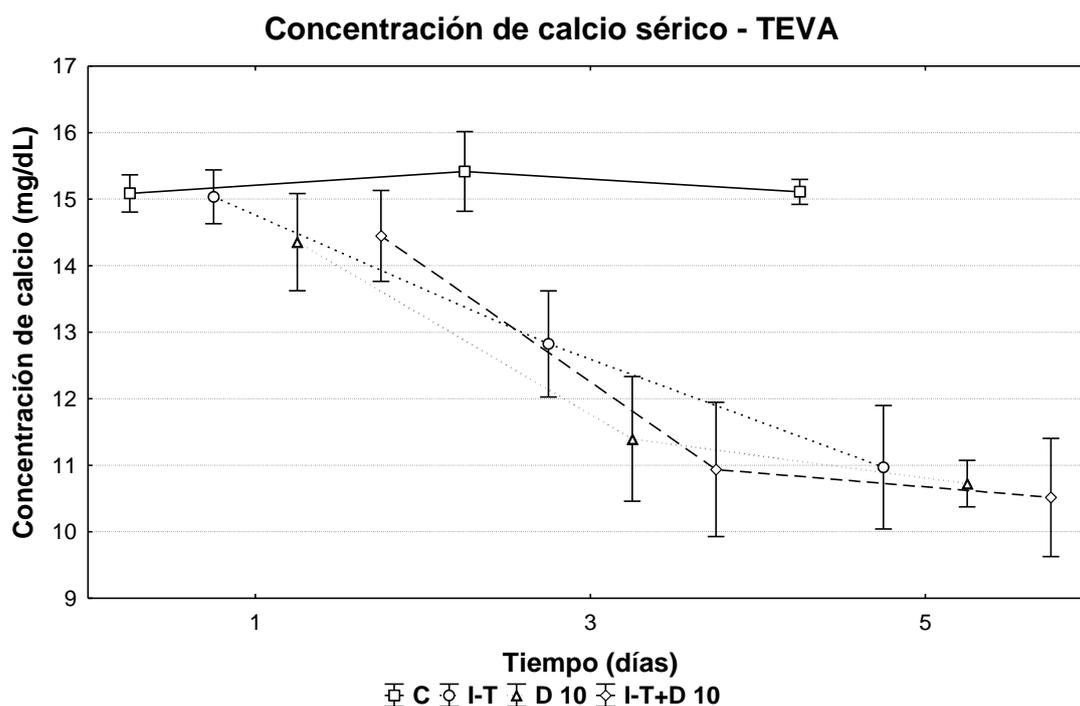


Figura 23. Se presenta el comportamiento de la concentración de calcio en los tratamientos en las infecciones experimentales por el aislado “Teva1”. Se puede observar la concentración de calcio sérico en los grupos control (C; cuadrado), droga 10mg/Kg (D 10; triangulo), infectado con el aislado “Teva1” (I-T; círculo) e Infectado más tratamiento con dosis diarias de droga a 10mg/Kg (I-T+D 10; rombo). Las líneas muestran el curso promedio de la concentración de calcio sérico, donde cada muestra presenta una media aritmética y su error estándar asociado.

Tabla 11. Cuadro obtenido a partir del cálculo de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 2-Factores ($\alpha=0.05$) realizado al hematocrito de los murinos en las infecciones experimentales por “Teva1”. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p<0.05$) para las variables Tiempo (Factor 1) y Tratamiento (Factor 2).

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tiempo	69,649	3	23,216	12,327	0,000011
Tratamiento	76,318	2	38,159	20,262	0,000001
Tiempo*Tratamiento	29,460	6	4,910	2,607	0,033458
Error	67,799	36	1,883		

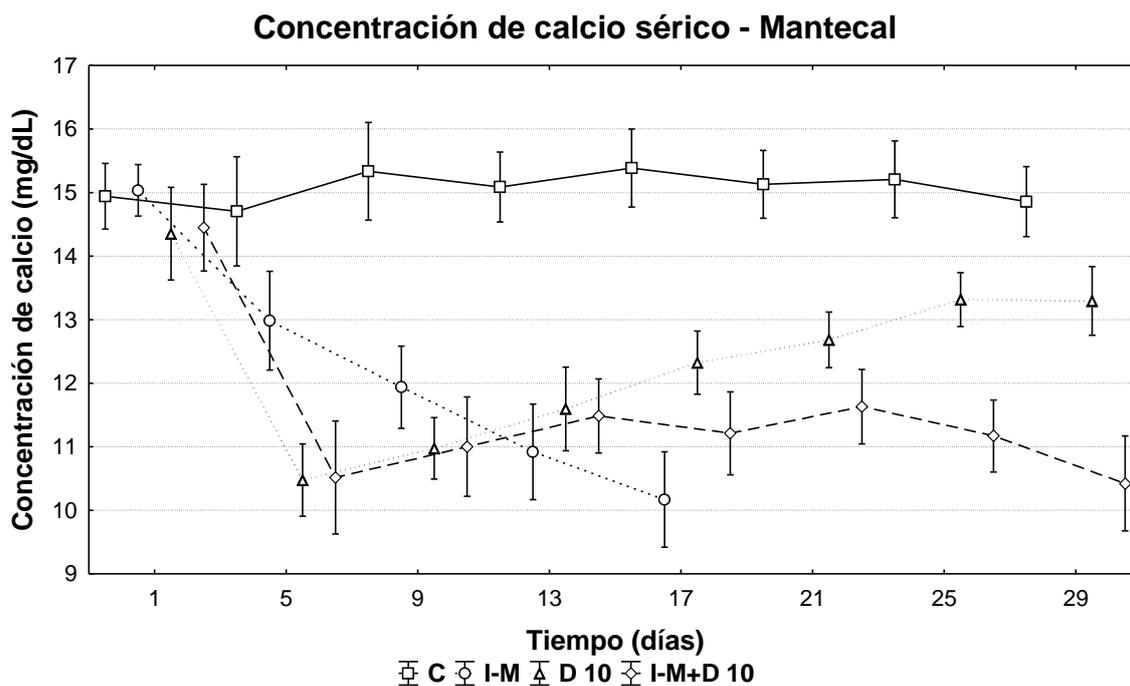


Figura 24. Se presenta el comportamiento de la concentración de calcio en los tratamientos en las infecciones experimentales por el aislado “Mantecal”. Se puede observar la concentración de calcio sérico en los grupos control (C; cuadrado), droga 10mg/Kg (D 10; triangulo), infectado con el aislado “Mantecal” (I-M; circulo) e Infectado más tratamiento con dosis diarias de droga a 10mg/Kg (I-M+D 10; rombo). Las líneas muestran el curso promedio de la concentración de calcio sérico, donde cada muestra presenta una media aritmética y su error estándar asociado.

Tabla 12. Cuadro obtenido a partir del cálculo de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de 2-Factores ($\alpha= 0.05$) realizado al hematocrito de los murinos en las infecciones experimentales por “Mantecal”. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p<0.05$) para las variables Tiempo (Factor 1) y Tratamiento (Factor 2).

	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	p
Tiempo	164,81	3	54,94	29,373	0,000000
Tratamiento	91,31	4	22,83	12,205	0,000000
Tiempo*Tratamiento	65,16	12	5,43	2,903	0,002752
Error	125,31	67	1,87		

IVe. Ultraestructura renal

El estudio de las patologías renales a nivel ultraestructural se centró en el glomérulo y en el túbulo contorneado proximal, estructuras particularmente susceptibles a los tratamientos en cuestión. En el glomérulo será importante observar la integridad de membrana plasmática en los capilares fenestrados y el grosor de la membrana basal. En el caso del túbulo contorneado proximal es de relevancia apreciar la integridad disposición y abundancia de las mitocondrias e interdigitaciones, el grosor de la membrana basal y el mantenimiento de la integridad celular.

Los resultados en la morfología ultraestructural normal de las células renales obtenida en los ratones sin tratamiento (control) se muestran en la Figura 25. En los túbulos contorneados proximales (Ver Figuras 24A, 24B y 24D) se encontraron mitocondrias en abundancias, distribuidas de manera ordenada en las cercanías de la membrana basal y estas se encontraban relacionadas estrechamente con las interdigitaciones. Además, pudieron notarse las microvellosidades generalmente encontradas en este tipo celular. También pudieron observarse (Ver Figura 24C) los capilares fenestrados característicos del glomérulo, estos muestran pedicelos regularmente distribuidos y una membrana basal que presenta un grosor aproximado entre 250-350 nm.

Las alteraciones ultraestructurales de murinos infectados experimentalmente por *T. evansi* pudieron evidenciarse notablemente luego de 15 días post-infección (Ver Figura 26). Los capilares fenestrados en el glomérulo mostraron tripomastigotes circulantes además de una acumulación de gotas lipídicas. En el caso del túbulo contorneado proximal pudo apreciarse una pérdida de las interdigitaciones, un engrosamiento en la lámina basal, mitocondrias poco abundantes (M), acumulación de gotas lipídicas (L) y tripomastigotes en la luz del capilar.

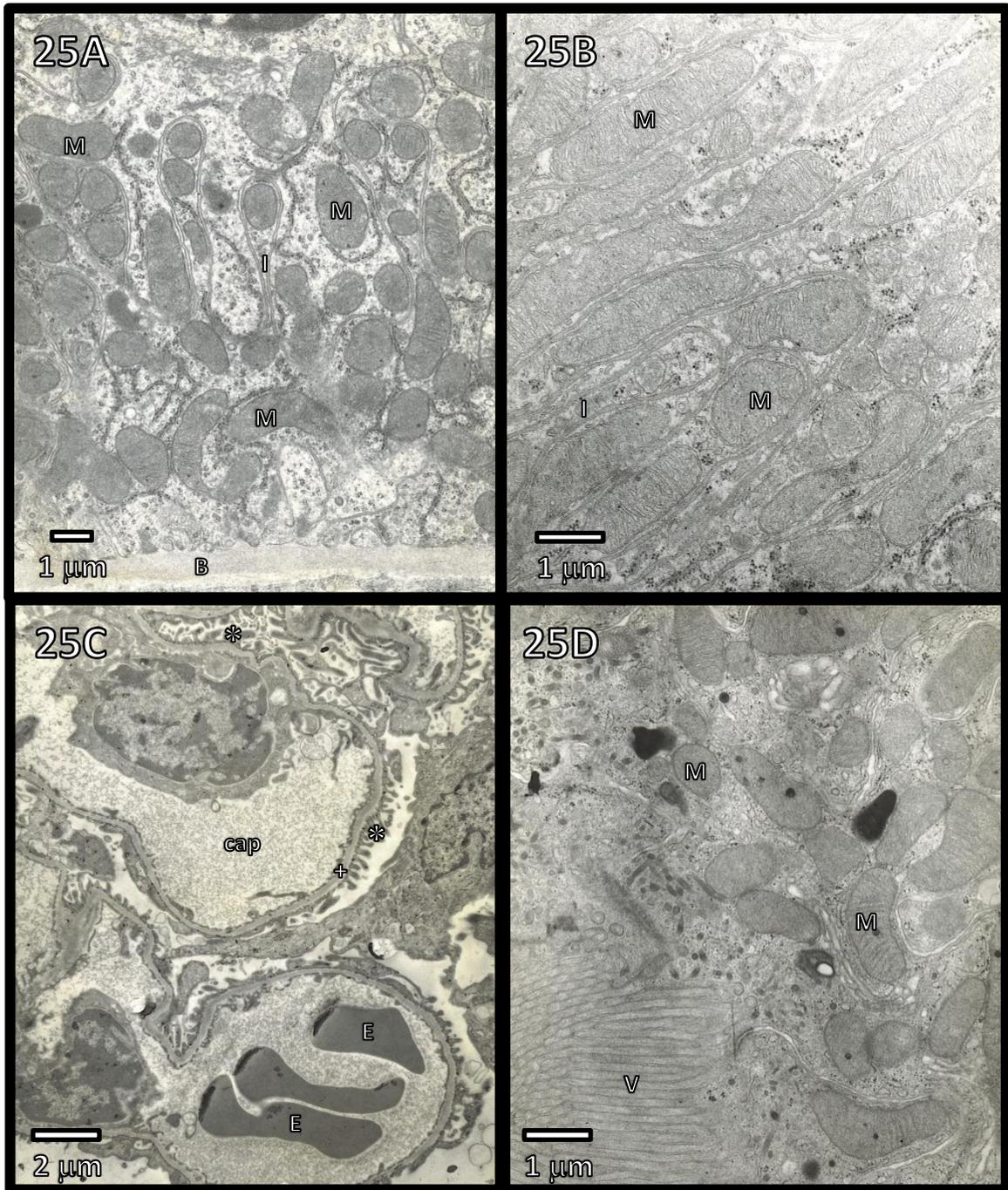


Figura 25. Morfología ultraestructural normal (control) del glomérulo y túbulo contorneado proximal de células renales. A. Un corte transversal del túbulo contorneado proximal evidencia la estrecha asociación que existe entre las mitocondrias (M), las interdigitaciones (I) y la membrana basal de las células renales. B. Se muestra la disposición ordenada característica de las mitocondrias en las interdigitaciones del túbulo contorneado proximal. C. La micrografía muestra la membrana basal (signo más) y los pedicelos (asterisco) característicos de un capilar fenestrado glomerular (cap). D. Se muestra las microvellosidades y mitocondrias abundantes presentes normalmente en un túbulo contorneado proximal.

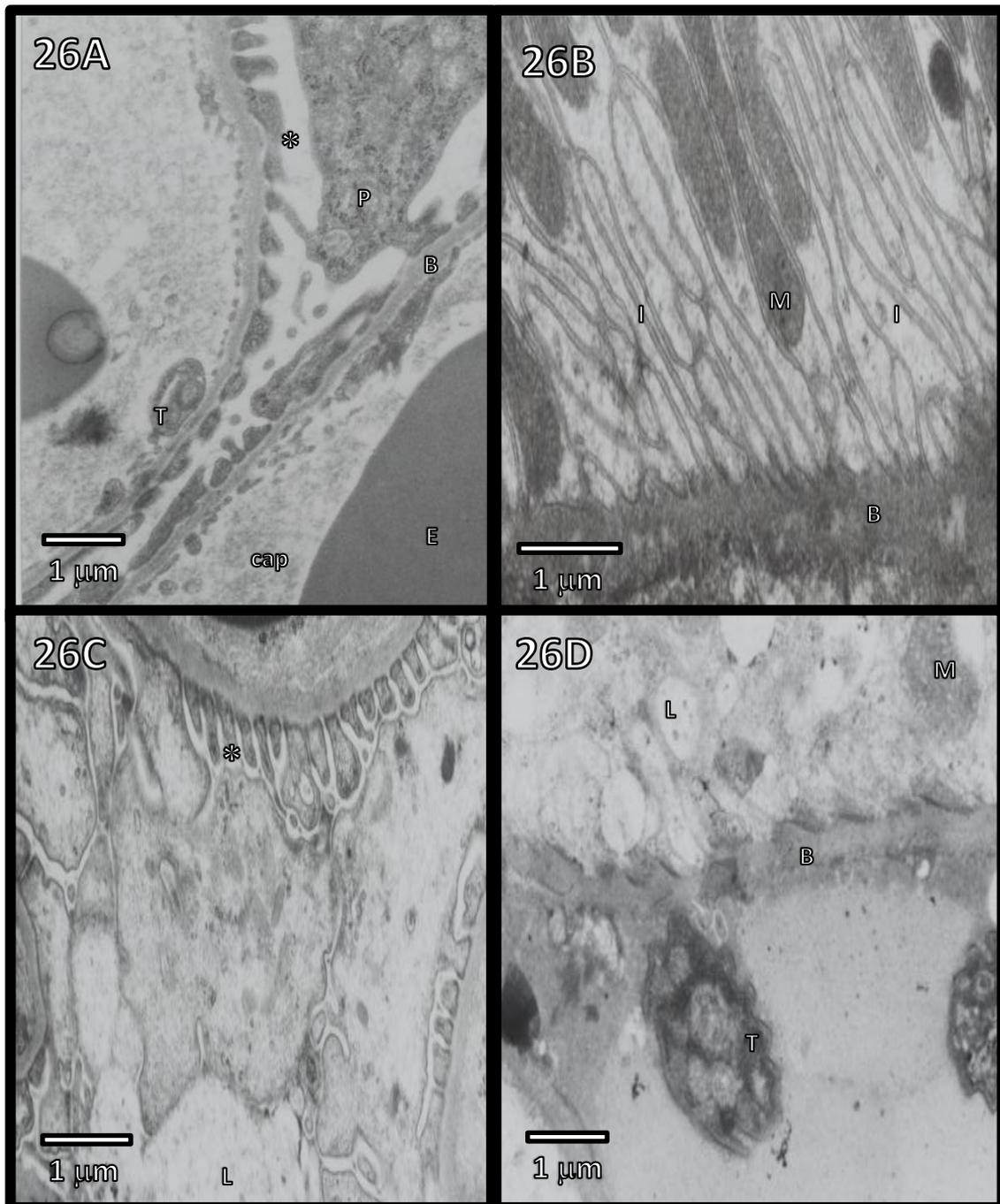


Figura 26. Se muestra la morfología ultraestructura renal característica de murinos infectados experimentalmente por *T. evansi* (15 días post-infección). A. Se muestra en el glomérulo una lámina basal (B), un podocitos (P), los pedicelos (asterisco) y un tripomastigote (T). B. Se puede notar una pérdida de las interdigitaciones (I) y un engrosamiento en la lámina basal (B). C. La micrografía muestra un glomérulo con acumulación de gotas lipídicas (L). D. Se muestra un túbulo contorneado proximal con pérdida total de las interdigitaciones, mitocondrias poco abundantes (M), membrana basal engrosada (B), acumulación de gotas lipídicas (L) y un tripomastigote en la luz del capilar.

En la Figura 27 se puede apreciar los resultados obtenidos en la ultraestructura renal de murinos tratados experimentalmente con una dosis diaria de pamidronato a 10 mg/kg después de 7 días de tratamiento. El glomérulo (Ver Figura 26A) mostró una morfología bastante conservada, se pudieron observar los capilares fenestrados con su membrana basal y pedicelos, también se observaron podocitos y eritrocitos en la luz de los capilares. El túbulo contorneado proximal (Ver Figuras 26B, C y D) presentó mitocondrias distribuidas irregularmente y una pérdida parcial, y en algunos casos pérdida total en las interdigitaciones, también pudieron observarse espacios libres en el citoplasma de este tipo de célula renal.

En la Figura 28 se muestran las micrografías resultantes de la microscopia realizada al riñón de ratones infectados experimentalmente por *T. evansi* y tratados con pamidronato 10mg/Kg una dosis diaria 15 y 21 días post-infección. El capilar glomerular (Ver Figura 27A) mostró una membrana basal sin engrosamiento y pedicelos con formas regulares. Por otro lado, el túbulo contorneado proximal mostró una pérdida en la disposición ordenada de las mitocondrias y las interdigitaciones (Ver Figura 27B), siendo evidente en algunos casos una pérdida parcial o total de estas estructuras y la formación de espacios libres en ciertas regiones (Ver Figuras 27C y 27D).

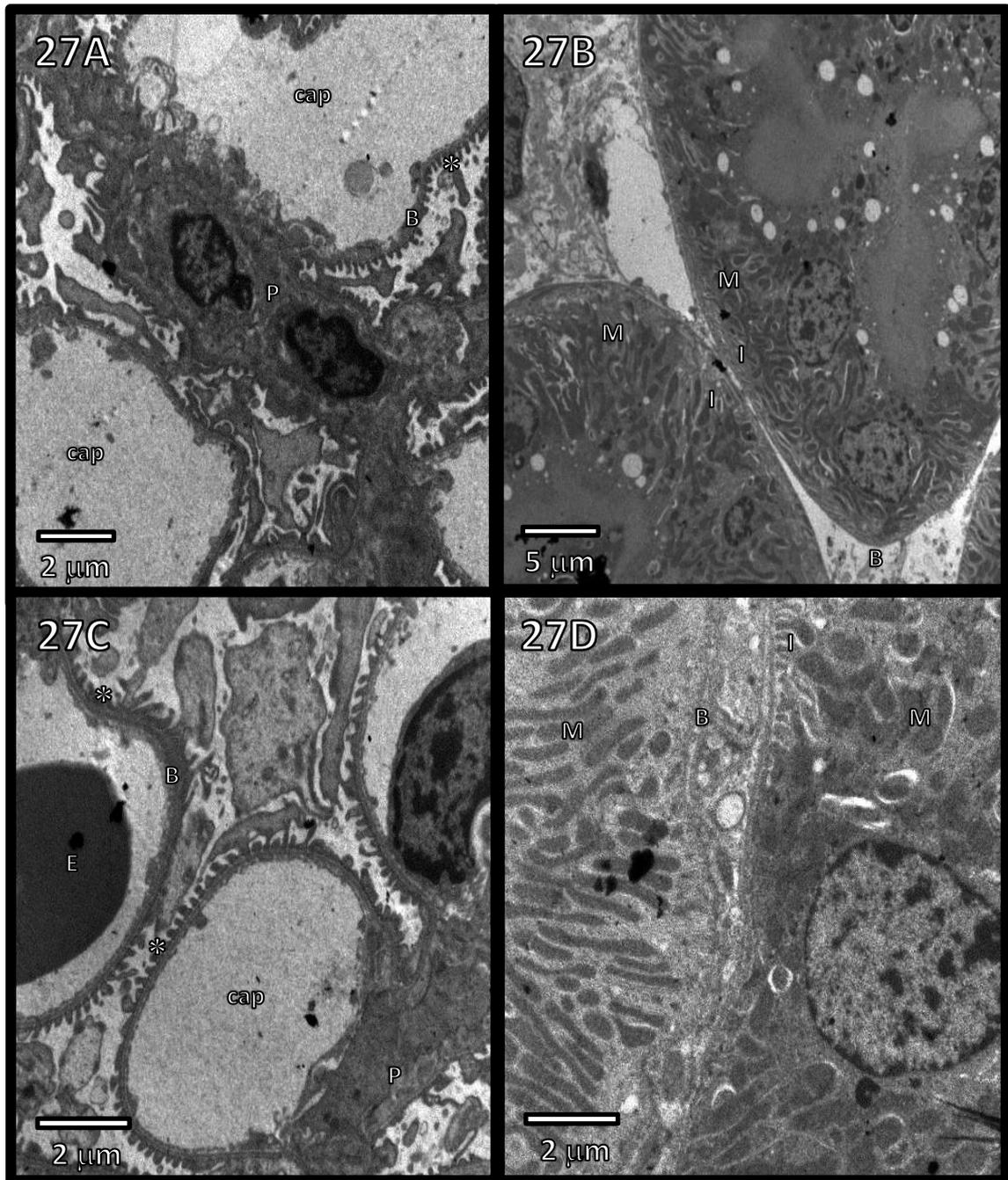


Figura 27. Aspectos de la ultraestructura renal en murinos tratados experimentalmente con pamidronato 10 mg/kg una dosis diaria. A. Se muestran dos podocitos (P) rodeando a los capilares fenestrados (cap), que exhiben una lámina basal sin engrosamiento (B) y los pedicelos (asterisco). B. Se observan mitocondrias (M) distribuidas irregularmente y una pérdida parcial de las interdigitaciones (I) en las cercanías de la membrana basal (B). C. La micrografía muestra un glomérulo con un podocito (P), pedicelos (asterisco), membrana basal (B) y un eritrocito (E). D. Se muestra una pérdida total de las interdigitaciones, mitocondrias irregularmente organizadas y espacios libres en ciertas regiones.

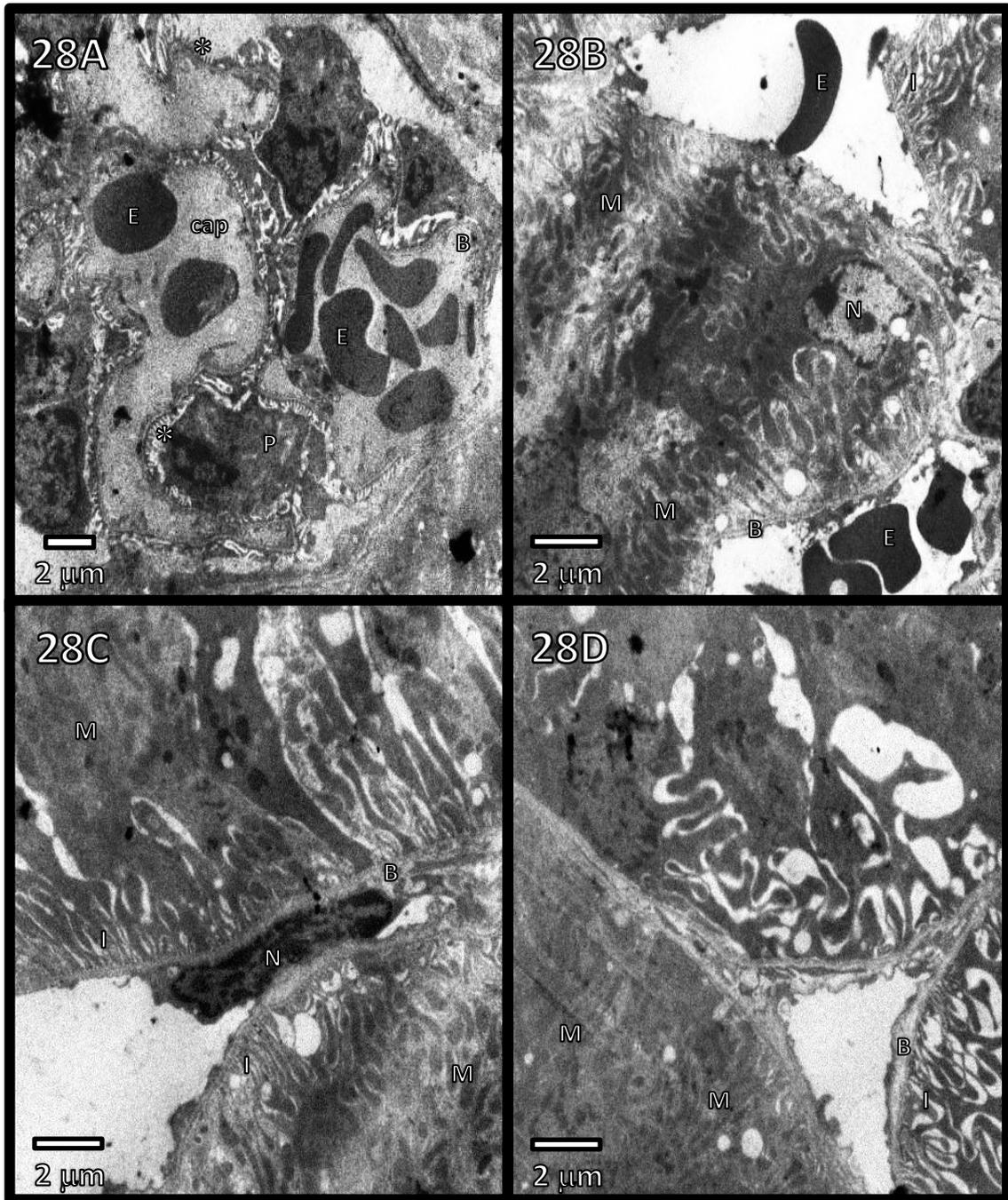


Figura 28. La ilustración presenta la morfología ultraestructural renal de ratones infectados experimentalmente por *T. evansi* y tratados con pamidronato 10 mg/Kg una dosis diaria A. Un corte transversal del glomérulo muestra la lámina basal sin engrosamiento (B) y los pedicelos (asterisco) en un capilar fenestrado. B. Se observa una pérdida en la disposición organizada de las mitocondrias (M) y las interdigitaciones (I) en el túbulo contorneado. C. Se pone en evidencia una pérdida parcial en las interdigitaciones (I) y una disminución mitocondrial (M) en las cercanías de la membrana basal (B), también se observa un núcleo hiper cromático (N). D. Se muestra una pérdida total de mitocondrias e interdigitaciones, además de la formación de espacios en ciertas regiones.

DISCUSION

T. evansi es el agente causal de la tripanosomosis equina, una afección animal con amplia distribución geográfica que produce anualmente una alta morbilidad y una mortalidad considerable en los equinos infectados, afectando así actividades de producción primaria de gran importancia económica como la ganadería bovina extensiva (Forlano y col., 2011). Por esta razón muchos investigadores han orientados numerosos estudios hacia la búsqueda de alguna quimioterapia para erradicar a este tipo de parásitos (Urbina, 2002; Urbina y Docampo, 2003; Kotsikorou y col., 2005; Mendoza, 2008). Bisfosfonatos como el pamidronato forman parte de las nuevas quimioterapias que están surgiendo para el tratamiento de estas enfermedades, sin embargo, es indispensable evaluar el efecto que estas tienen en animales experimentales antes de ser implementadas. Los resultados obtenidos en este estudio son un aporte importante en este contexto, ya que, al evaluar diferentes parámetros clínicos en el hospedador (peso corporal, hematocrito, calcio sérico, funcionamiento renal) y algunos parámetros parasitológicos (sobrevida y parasitemia) se puede comprobar cuál es el efecto del pamidronato en la tripanosomosis animal a nivel experimental.

I. Efecto del pamidronato en cultivos *In vitro* de *T. evansi*

El objetivo de este ensayo consistió en comprobar la actividad tripanocida del pamidronato sobre aislados venezolanos de *T. evansi*. Los estudios referentes a la utilización de bisfosfonatos en este tripanosomatideo son escasos (Mendoza y col., 2008), este hecho resalta la importancia de comprobar la actividad tripanocida de esta droga en cultivos *in vitro* antes de evaluar el efecto de este fármaco en infecciones experimentales.

Los cultivos *in vitro* fueron iniciados con una parasitemia de 1×10^5 flagelados/mL. Este nivel de carga parasitaria se considera punto de inicio de la fase de crecimiento exponencial en *T. evansi* (Perrone y col., 2006). Es bien sabido que esta etapa es altamente recomendada para iniciar cultivos *in vitro*, ya que, en este punto se asegura la adecuada evolución del cultivo (Saldaña y col. 2006). Nuestros resultados confirman como la proliferación apropiada de los parásitos en cultivo ya puede

observarse claramente a las 24 horas de haber iniciado el ensayo, debido a que en este punto todas las replicas alcanzan parasitemias cercanas a 1×10^6 (Ver Figura 12). Una vez que se comprobó la efectividad del cultivo se procedió a añadir los tratamientos.

Como resultado inicial se tiene que los cultivos de los grupos controles presentaron parásitos durante más tiempo que los tratamientos. Este resultado es evidente a las 72 horas de cultivo donde el grupo control todavía mantenían la carga parasitaria mientras que en todas las réplicas de los grupos tratados ya no podían verse parásitos (Ver Figura 12). Este hecho confirma parcialmente la actividad tripanocida del pamidronato en un modelo *in vitro*. Otro hallazgo importante se observó luego de 48 horas de haber iniciado el cultivo, ya que, en este punto se puede observar como ocurre una disminución significativa ($p < 0.05$; Tabla 1) en la parasitemia de los grupos tratados (Ver Figura 12). Este decremento es proporcional a la concentración de la droga aplicada, además es evidente el potencial que tiene el pamidronato para inhibir la proliferación de *T. evansi*.

El trabajo pionero de Urbina y col. en 1999 demuestra que el pamidronato puede ejercer un efecto inhibitorio marcado en la proliferación de amastigotes de *T. cruzi* en cultivos *in vitro*, obteniendo un 50 % de inhibición de la proliferación celular a una concentración del fármaco de 60 μM . Posteriormente, Martin y col. (2001) reportaron el efecto de diversos bisfosfonatos sobre la proliferación en cultivo de algunas especies de tripanosomatideos, entre los que se encuentran *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. donovani*. Estos autores encontraron que los aminobisfosfonatos inhibían notablemente la proliferación de los tripanosomatideos evaluados. Además, los autores evaluaron la síntesis de esteroides en presencia de bisfosfonatos y obtuvieron una disminución apreciable en el porcentaje de esteroles producidos, por lo que pudieron concluir que estos bisfosfonatos pueden inhibir la ruta de la biosíntesis de esteroides a nivel de la farnesil pirofosfato sintetasa. Por su parte, Montalvetti y col. en el mismo año demuestran como diversos bisfosfonatos (incluyendo al pamidronato) pueden inhibir fuertemente a la farnesil pirofosfato sintetasa de *T. cruzi*, enzima fundamental en el funcionamiento del acidocalcisoma en tripanosomatideos. En este estudio el pamidronato resultó ser el tercer bisfosfonato más potente en la inhibición de la farnesil pirofosfato sintetasa después del risendronato y el alendronato.

Basándonos en nuestros resultados se puede concluir que el pamidronato también produce una fuerte inhibición en la proliferación de *T. evansi* en cultivo, lo que confirma la actividad tripanocida de este fármaco en un modelo *in vitro*.

II. Determinación de la concentración de pamidronato a utilizar en el ensayo *in vivo*

Se evaluaron concentraciones crecientes de pamidronato (7,5 – 20 mg/Kg) administrando una o dos veces al día y se monitoreó la sobrevida de los murinos durante el tratamiento, con la finalidad de determinar la concentración límite no letal del fármaco. La sobrevida en este tipo de ensayos puede considerarse una variable indicadora de toxicidad en los murinos (Montalvetti y col., 2003; Mendoza y col., 2008), por lo cual es indispensable considerar el porcentaje de sobrevida a la hora de decidir la concentración de droga a utilizar en los experimentos *in vivo*.

Los resultados muestran como los tratamientos de 10 mg/Kg y 7,5 mg/Kg dos veces diarias producen una disminución significativa ($p < 0.05$; Tabla 2) y progresiva en la sobrevida hasta llegar a un 0% después de 4 o 6 días de tratamiento respectivamente (Ver Figura 13). Por su parte, los tratamientos con 7,5 mg/Kg y 10 mg/Kg una vez al día muestran una sobrevida del 100% durante todo el periodo de experimentación (30 días), lo que permite mantener con vida a los murinos durante todo el tratamiento. Estos resultados indican que en este estudio la concentración límite no letal de pamidronato en el modelo murino es de 10 mg/Kg una vez al día. Por esta razón, el tratamiento con 10 mg/Kg una vez al día demuestra ser el más adecuado para utilizar en las infecciones experimentales, pues este tratamiento posee la mayor cantidad de fármaco que se puede aplicar para atacar al parásito y presenta un máximo de sobrevida (Ver Figura 13). Además, se puede observar como los tratamientos con las concentraciones más altas de droga (10 mg/Kg y 7,5 mg/Kg dos veces diarias) resultan letales para los individuos tratados. Estos resultados sugieren toxicidad por dosis excesivas de pamidronato, siendo el efecto tóxico ocasionado por esta droga proporcional a la concentración de droga suministrada.

Urbina y col. (1999) utilizan un tratamiento de pamidronato a 10 mg/Kg con dosis diarias durante 7 días para evaluar el efecto de este fármaco en la proliferación de *T. cruzi* en un modelo experimental murino. En este estudio los investigadores logran mantener con vida a la mayoría de los murinos durante todo el tratamiento y consiguen una disminución importante de los tripomastigotes en sangre. Por su parte, Montalvetti y col. (2003) utilizan tratamientos de pamidronato a 10 mg/Kg una vez al día por 5 días para comprobar el efecto del medicamento en infecciones experimentales por *T. brucei*. Estos autores aseguran la presencia de efectos secundarios en los murinos (toxicidad) y consideran inefectivo al tratamiento en las infecciones experimentales por este parásito. Sin embargo, el porcentaje de sobrevivencia no fue afectado a causa del fármaco. Más recientemente, Mendoza y col. (2008) demuestran que tratamientos con risendronato a concentraciones superiores de 10 mg/Kg por 7 días con dosis únicas o separadas, producen una disminución importante en el porcentaje de sobrevivencia en los grupos tratados.

Por otro lado, algunos autores sugieren que la administración en dos dosis diarias de otros bisfosfonatos como el risendronato permite aumentar la cantidad de fármaco que se puede aplicar y resulta mejor tolerado por los animales (Montalvetti y col., 2003; Mendoza y col., 2008). No obstante, nuestros resultados muestran que las dosis con pamidronato que estuvieron por encima de 10 mg/Kg aun cuando se separaron en dos dosis diarias fueron tóxicas para los murinos y produjeron una disminución total en el porcentaje de sobrevivencia, hecho que descarta totalmente la posibilidad de realizar un tratamiento con estas concentraciones en las infecciones experimentales.

Uniendo los resultados obtenidos por nosotros y las observaciones realizadas por otros investigadores mencionadas anteriormente, se decidió utilizar un tratamiento con pamidronato de 10 mg/Kg una vez al día en las infecciones experimentales.

III. Evaluación del pamidronato en infecciones experimentales murinas por *T. evansi*.

La sobrevida también puede considerarse una variable indicadora de susceptibilidad a la infección parasitaria (Perrone y col., 2006). Además, el porcentaje de sobrevida puede confirmar la efectividad del tratamiento (Urbina y col., 1999; Montalvetti y col., 2003; Mendoza y col., 2008). Un aumento en la sobrevida o un incremento en el tiempo de vida en los individuos infectados puede obtenerse por el tratamiento con un fármaco. La parasitemia igualmente es una variable importante en el presente estudio, ya que es un indicador directo del desencadenamiento de los procesos fisiológicos y moleculares asociados a la afección ocasionada por este parásito (Perrone y col., 2006). Asimismo, el monitoreo de la parasitemia será fundamental para corroborar el efecto del pamidronato en el parásito.

La sobrevida y la carga parasitaria obtenida con el aislado “Teva1” no muestran disimilitudes significativas ($p < 0.05$, Tabla 3) entre los grupos infección e infección más tratamiento (Ver Figuras 14 y 16). En la Figura 16 puede notarse como este aislado puede reproducirse tan rápidamente en el hospedador que solo presenta un periodo de prepatencia de dos días y una fase aguda de apenas tres días, produciendo posteriormente la muerte de los murinos tanto en el grupo infectado como en el grupo infectado más tratamiento.

A pesar de esto, Mendoza y col. (2008) logran obtener cura parasitológica al realizar tratamientos con risendronato a murinos infectados experimentalmente con el aislado “Teva1”. Estos autores realizaron tratamientos por 7 días con risendronato a una concentración de 5 y 7,5 mg/Kg dos veces diarias, obteniendo una inhibición en la proliferación celular del parásito y en algunos casos una drástica disminución de la carga parasitaria hasta hacerse cero por el resto del periodo de observación. Sin embargo, Montalvetti y col. (2003) demuestran que el risendronato es el bisfosfonato que produce mayor inhibición en la franesil pirofosfato sintetasa, siendo casi 30 veces más potente que el pamidronato. Así, la velocidad de reproducción de “Teva1”, el corto periodo del tratamiento realizado y las propiedades farmacocinéticas del pamidronato, pueden explicar la ineficiencia del tratamiento, siendo inevitable finalmente la muerte

de todos los roedores con tan solo 5 días de experimentación.

Por su parte el aislado “Mantecal” genera en el murino una enfermedad menos aguda, que se caracteriza por mostrar un periodo de prepatencia de 3 días, una fase aguda de 14 días y que produce la muerte de todos los individuos luego de 17 días post-infección (Ver Figuras 15 y 17). Este modelo permite un tratamiento completo de 7 días con pamidronato y contribuye a que el fármaco pueda generar su efecto en el parásito.

Los resultados obtenidos con este aislado en el grupo infección más tratamiento demuestran un efecto significativo del pamidronato en las infecciones experimentales ($p < 0.05$, Tabla 4), ya que, se pudo obtener una aparición tardía de los parásitos en sangre (aumento del periodo de prepatencia) y aumento en el tiempo de vida en los murinos de 17 a 28 días (Ver Figura 15). A pesar de que estos resultados no muestran cura parasitológica en los murinos si confirman inhibición en la proliferación de *T. evansi* por efecto del pamidronato y demuestran la actividad tripanocida de este fármaco en un modelo *in vivo*.

Urbina y col. en 1999 obtienen resultados similares al usar pamidronato en infecciones experimentales murinas por *T. cruzi*. Estos investigadores realizaron tratamientos con pamidronato a 10 mg/Kg una vez diaria por 7 días obteniendo una aparición tardía de los tripomastigotes en sangre, aumentando así el periodo de prepatencia unos cuatro días.

También, se ha reportado en la literatura que tratamientos con bisfosfonatos como el risendronato en la enfermedad del chagas produce una disminución en la parasitemia sin generar cura parasitológica en el modelo experimental murino. Garzoni y col. (2004) y Bouzahzah y col. (2005) realizaron tratamientos con risendronato en infecciones experimentales por *T. cruzi* en un modelo murino. Los autores demuestran una disminución significativa en la carga parasitaria, sin presentar cura parasitológica. Ellos proponen que estos resultados pueden deberse a la naturaleza diseminativa de la enfermedad, a las propiedades farmacocinéticas del fármaco utilizado y al corto periodo de tratamiento usado.

IV. Efecto del pamidronato sobre el modelo experimental murino.

Evaluar la condición clínica de los murinos por efecto del tratamiento con pamidronato fue fundamental para comprobar los beneficios del tratamiento con este fármaco. En este sentido, cabe resaltar que algunas reacciones adversas fueron observadas en los murinos por el tratamiento con pamidronato.

IVa. Condición clínica

Los individuos tratados con dosis diarias de pamidronato a 7,5 y 10 mg/Kg mostraron una condición clínica aparentemente óptima. Por su parte, los murinos con tratamientos de pamidronato a 7.5 mg/Kg y 10 mg/Kg dos veces diarias mostraron reacciones adversas claramente notables en la condición clínica de los roedores. El efecto secundario más evidente en estos murinos fue la presencia de alopecia (perdida de pelaje), principalmente en la región abdominal, el lomo y el cuello. Otra afección notable pudo evidenciarse a nivel de las mucosas, siendo notoriamente apreciable una dilatación e irritación en la mucosa ocular y vaginal (Ver Figura 18). Además, cabe resaltar que la mayoría de los murinos con estos tratamientos (7.5 mg/Kg y 10 mg/Kg dos veces diarias) presentaron la muerte con solo 4 o 6 días de tratamiento (Ver Figura 13), hecho que sugiere que estos síntomas son signos de toxicidad por exceso de pamidronato.

La toxicidad asociada a los tratamientos con bisfosfonatos puede deberse a diversos factores. Uno de los factores que presenta más relevancia en la aparición de reacciones adversas por bisfosfonatos se refiere a la rápida administración (varias dosis diarias) y a la aplicación de concentraciones excesivas del fármaco (Torregrosa y Ramos, 2010). La mayoría de los estudios bajo condiciones de exceso de pamidronato se refieren a la aplicación de quimioterapias en enfermedades de humanos como hipercalcemia maligna o hipercalcemia por metástasis óseas en cáncer de mama o mieloma múltiple (Hernández y col., 2005). Rosen y col., (2003) evalúan el efecto del tratamiento con ácido zolendronico y pamidronato sobre pacientes con metástasis óseas en cáncer de mama. Estos autores reportan diversos efectos secundarios producto de los tratamientos con estos fármacos, entre los cuales cabe destacar la presencia de alopecia en un 15% de los individuos tratados.

Por otro lado, los estudios referentes a las patologías generadas en las mucosas por tratamientos con bisfosfonatos son escasos. No obstante, Yamaguchi y col. (2000) comprueba que la inyección de diversos bisfosfonatos (incluyendo el pamidronato) por vía intraperitoneal causa reacciones inflamatorias en murinos, entre las cuales cabe destacar la presencia de fiebre y un aumento en la cantidad de histaminas. Estos resultados vislumbran una explicación parcial del efecto inflamatorio obtenido en las mucosas de los murinos tratados con pamidronato.

Definitivamente, es importante resaltar en este contexto que los efectos secundarios producidos por el tratamiento con pamidronato estuvieron presentes en los tratamientos que implicaban una aplicación rápida y excesiva de este fármaco, lo cual sugiere una relación entre las reacciones adversas y la cantidad de droga empleada.

IVb. Peso corporal

El peso es una de las variables clínicas indicadoras de la susceptibilidad de un animal ante la acción de un agente patógeno o una quimioterapia (Montalvetti y col., 2003; Perrone y col., 2006).

Los resultados obtenidos en este contexto (Ver Figuras 19 y 20) demuestran como la variable peso disminuye significativamente ($p < 0.05$, Tabla 7 y 8) con la infección parasitaria por los dos aislados. Esta es una cualidad característica de la tripanosomosis animal (Perrone y col., 2006). En el caso de los grupos tratados sin infección puede notarse como el peso corporal de los roedores no muestra incremento durante el crecimiento, mientras el grupo control aumenta de peso significativamente ($p < 0.05$, Tabla 7 y 8). En las infecciones experimentales por “Teva1” este efecto solo puede verse en el último día de evaluación en el grupo tratado sin infección. Por la velocidad de la afección que este aislado produce en el murino, el grupo infectado mas tratamiento muestra el mismo comportamiento que el grupo infectado sin tratamiento, en donde es evidente una disminución pronunciada y significativa en el peso ($p < 0.05$, Tabla 7).

En las infecciones experimentales con “Mantecal” también pudo notarse un efecto significativo del tratamiento sobre el murino ($p < 0.05$, Tabla 8), siendo además

evidente un aumento de peso al terminar el tratamiento. El grupo infección más tratamiento también mostró un mantenimiento en el peso durante el tratamiento, presentándose una disminución de peso después del tratamiento con la aparición del parásito en los murinos (Ver Figuras 19 y 20).

De acuerdo a Perrone y col. (2006), el peso corporal es una variable indicadora de susceptibilidad, así, una disminución en el peso de animales infectados por este parásito puede adjudicarse al desgaste producido en el organismo para sobrellevar la enfermedad. Por otro lado, Rosen y col., (2003) adjudican la pérdida de peso en pacientes tratados con pamidronato a las dosis excesivas de fármaco utilizadas para el tratamiento de hipercalcemia maligna. Estos autores consiguen una pérdida de peso en un 9 % de los pacientes evaluados.

Los resultados obtenidos por Rosen y col., en 2003 son similares a los obtenidos por nosotros en el modelo murino. Así, las dosis excesivas de pamidronato podría explicar la variación en el peso producida en algunos de los murinos tratados.

IVc. Hematocrito

El porcentaje de hematocrito es una variable indicadora de anemia en el individuo, ya que, estima la fracción de eritrocitos presentes en la sangre. La variable hematocrito podría ser indicadora de la condición clínica del animal a causa de la infección y el tratamiento. (Perrone y col., 2006; Sanchez, 2008)

Los porcentaje de hematocrito en los grupos tratados con dosis diarias de pamidronato a 10mg/Kg sin infección demuestran ser muy similares a los controles, lo que indica que la droga no tiene un efecto significativo ($p < 0.05$, Tabla 9 y 10) sobre esta variable clínica (Ver Figuras 21 y 22). En las infecciones experimentales por los dos aislado “Teva1” y “Mantecal” se presenta una disminución drástica en el porcentaje de hematocrito con respecto al control (Ver Figuras 21 y 22). En el caso de los murinos tratados e infectados con “Mantecal” esta disminución se presenta de forma tardía correspondiendo con la aparición retardada de los parásitos por efecto del pamidronato.

La anemia se define como un estado clínico caracterizado por un descenso en la masa de eritrocitos o bien una disminución de la hemoglobina, siendo producto generalmente de muchos factores o afecciones en el individuo (Sanchez, 2008). En la tripanosomosis, la patogénesis de la anemia es un cuadro multifactorial complejo que, según el estado de desarrollo de la infección, puede deberse a hemólisis, a lisis eritrocitaria, a dishemopoyesis por trastornos en la maduración de eritrocitos, a eritrofagocitosis por acción de macrófagos mononucleares y/o a hipervolemia por aumento del volumen plasmático (Menezes y col., 2004; Valera y col., 2005; Perrone y col., 2006). Así, la infección parasitaria por *T. evansi* puede alterar notablemente el porcentaje de hematocrito en los murinos afectados por esta enfermedad.

Por otro lado, algunos autores adjudican la disminución del porcentaje de hematocrito al tratamiento con dosis excesivas de pamidronato (Rosen y col., 2003; Torregrosa y Ramos, 2010). Rosen y col., (2003) consiguen una disminución en el porcentaje de hematocrito en el 30% de los pacientes tratados con pamidronato en hipercalcemia maligna. A pesar de esto, los murinos tratados con dosis diarias de pamidronato a 10 mg/Kg en nuestros ensayos, no mostraron una disminución importante en el porcentaje de hematocrito. Es posible que este tratamiento no fuera suficientemente excesivo como para disminuir de forma notable el hematocrito y mucho menos como para generar anemia en el individuo. Así, el tratamiento con dosis diarias de pamidronato a 10 mg/Kg por 7 días muestra una cualidad importante sobre los tratamientos con mayores concentraciones de fármaco que en algunos casos resultaron hasta letales para los murinos.

IVd. Calcio Sérico

El calcio sérico también puede ser una variable clínica importante a evaluar cuando se realizan tratamientos con bisfosfonatos, pues ya se ha descrito que estos tienen la capacidad de producir hipocalcemia en los individuos tratados (Arrabal y col., 2007; Torregrosa y Ramos, 2010).

Las concentraciones de calcio obtenidas en los murinos controles estuvieron alrededor de 15 mg/dL. Un hallazgo interesante obtenido en este sentido se refiere a las disimilitudes encontradas entre los valores de calcio sérico en los murinos sanos y los

ya descritos en la literatura para la especie (7,1 a 10,1 mg/dL) (<http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html>). Sin embargo, Cañizares y Álvarez en 2008 consiguen que la concentración de calcio sérico en ratones sanos de la cepa NMRI puede llegar a mostrar valores de 20 mg/dL. Esto autores consiguen estas discrepancias al evaluar el efecto de la acliamida y cianoacrilato sobre la concentración de cationes en suero de murinos.

En las infecciones experimentales por el aislado “Teva 1” se puede apreciar como los tratamientos (incluyendo el grupo infectado) presentan una disminución significativa ($p < 0.05$, Tabla 11) de la concentración de calcio sérico desde el día 3 post infección. Por su parte, los grupos de tratados en las infecciones experimentales por “Mantecal” también exhiben una disminución considerablemente significativa ($p < 0.05$, Tabla 12) de la concentración de calcio sérico, a diferencia de que puede notarse una leve recuperación con la suspensión del tratamiento (Ver Figura 23).

Los bisfosfonatos están relacionados con la inhibición de los procesos de resorción ósea, en donde los osteoclastos se encargan de eliminar tejido óseo liberando minerales como el calcio desde la matriz ósea a la sangre. La disminución de calcio en el hueso generada por el proceso de resorción ósea, hace necesaria una mayor demanda de este ion por parte de los osteoblastos, para que estos puedan reponer el calcio perdido por el tejido óseo (Riancho, 2002; Torregrosa y Ramos, 2010). Por esto, en humanos la medicación con este tipo de fármacos en individuos con hipocalcemia se encuentra contraindicado y se recomienda aplicar estos tratamientos conjunto con citrato de calcio y vitamina D (Arrabal y col., 2007). Así, la demanda excesiva de calcio producto del efecto de pamidronato puede explicar cómo la concentración de calcio sérico puede verse disminuida en los murinos con el tratamiento por bisfosfonatos, más aun cuando las dosis aplicadas con el objetivo de eliminar al parásito en este estudio son tan excesivamente altas.

Por su parte, los individuos infectados también muestran una disminución significativa en la concentración de calcio en suero, que se hace más pronunciada con el incremento de la parasitemia. Los conocimientos y referencias existentes sobre el efecto de este parásito sobre la concentración de este ion en la sangre son escasos. Sin

embargo, Rossi y col. en 1999 sugieren que las alteraciones ocasionadas por este parásito en la glándula adrenal pueden ser consecuencia de un estado de hipocalcemia generado en el hospedador a causa de la tripanosomosis.

IVd. Ultraestructura Renal

La evaluación de la integridad y funcionamiento renal en este estudio adquiere importancia al tenerse reportes de insuficiencia renal en individuos tratados con dosis excesivas de bisfosfonatos (Torregrosa y Ramos, 2010). Por ello, se evaluó la morfología ultraestructural de las células renales en el glomérulo y en el túbulo contorneado proximal a partir de microscopía electrónica.

El grupo tratado con dosis diarias de pamidronato a 10 mg/Kg evidenció una pérdida total de las interdigitaciones, una disminución en la abundancia mitocondrial y la generación de espacios libres y regiones electrón densas dentro de la célula en el túbulo contorneado proximal. No obstante, alteraciones a nivel de glomérulo no pudieron ser observadas (Ver Figura 27). Ghadially (1997) describe la ultraestructura renal de murinos sanos. Este autor resalta la presencia de invaginaciones con interdigitaciones profundas asociadas íntimamente a mitocondrias en abundancia y una membrana basal que presenta un grosor aproximado entre 250-350 nm a nivel del túbulo contorneado proximal. Estas características fueron observadas en la ultraestructura renal de los individuos controles (Ver Figura 25).

Los resultados obtenidos por nosotros en la ultraestructura renal de los murinos tratados con pamidronato exhiben diferencias claras a las reportadas por Ghadially en 1997. Tejero y col. (2009) argumentan que el arreglo mitocondrial en las interdigitaciones y la abundancia de mitocondrias presente en el túbulo contorneado proximal de las células renales resulta indispensable para el función tubular, así una pérdida en la conexión funcional produce consecuentemente un debilitamiento gradualmente creciente en la función tubular. De esta forma, se puede confirmar por microscopía electrónica de transmisión la toxicidad renal causada por tratamientos con pamidronato, patología conseguida anteriormente por otros investigadores a partir de la cuantificación de creatinina en pacientes humanos (Torregrosa y Ramos, 2010).

Por otro lado, es importante resaltar que posiblemente las patologías a nivel de glomérulo en los tratamientos con pamidronato no hayan podido ser detectadas debido a que los bisfosfonatos producen en el riñón una glomeruloesclerosis focal y segmentaria, en la cual solo algunos glomérulos se encuentran afectados y solo parte de ellos se encuentran dañados, lo que dificulta la detección de esta patología por microscopia electrónica de transmisión (Thomas y col., 2006; Torregrosa y Ramos, 2010).

En el caso de los grupos infectados pudo apreciarse a nivel de túbulo contorneado proximal una pérdida de las interdigitaciones, un engrosamiento en la lámina basal, mitocondrias poco abundantes, acumulación de gotas lipídicas y un tripomastigote en la luz de un capilar. El glomérulo exhibió tripomastigotes circulantes en los capilares fenestrados y una acumulación de gotas lipídicas (Ver Figura 26). Ghadially (1997) también reporta la ultraestructura renal del glomérulo en un tejido renal sano de murinos. El autor hace notar la presencia capilares fenestrados con pedicelos regularmente distribuidos y una membrana basal con grosor aproximado de 300 nm en el glomérulo renal.

Los resultados obtenidos por nosotros en la ultraestructura renal de los murinos infectados experimentalmente por *T. evansi* también evidencia notables diferencias en comparación a la mostrada por el grupo control (Ver Figura 25). Las patologías ultraestructurales renales en infecciones experimentales murinas por *T. evansi* ya han sido descritas por Tejero y col. (2009). Ellos indican que tales patologías pueden inducir el desarrollo de una falla renal aguda que evoluciona progresivamente y contribuye con la afección ocasionada por este parásito en el murino produciéndole a la muerte.

Finalmente, el grupo infección más tratamiento también mostró alteraciones significativas en el túbulo contorneado proximal. Entre estas patologías se pueden mencionar la pérdida en la disposición ordenada de las mitocondrias y las interdigitaciones y la formación de espacios libres y electrón densos en ciertas regiones (Ver Figura 28). Las alteraciones de glomérulo en este tratamiento no pudieron ser observadas.

CONCLUSIONES

- El uso de pamidronato en cultivos *in vitro* produce una disminución estadísticamente significativa en la parasitemia, resultado que comprueba la actividad tripanocida del pamidronato en *T. evansi*.
- La concentración límite no letal de pamidronato que se puede utilizar en el modelo experimental murino es de 10 mg/Kg una vez al día, tratamientos con mayores concentraciones de este fármaco produce una disminución significativa en el porcentaje de sobrevida
- La aplicación de un tratamiento con pamidronato a dosis únicas diarias de 10mg/Kg por 7 días produce un aumento del periodo de prepatencia y un incremento del tiempo de vida en murinos infectados experimentales con el aislado “Mantecal”. En el aislado “Teva1” el tratamiento con pamidronato no mostró efectividad
- El uso de tratamientos por 7 días con pamidronato a concentraciones mayores de 10 mg/Kg, producen efectos secundarios marcados en los murinos. Entre estos se puede mencionar una pérdida importante del pelaje, una afección a nivel de las mucosas y la muerte de los murinos.
- El peso corporal puede verse afectado significativamente por el tratamiento con pamidronato, pudiéndose generar un retardo del crecimiento en murinos juveniles.
- El porcentaje de hematocrito no se ve modificado significativamente por el tratamiento con pamidronato a 10 mg/Kg una vez al día.
- La concentración de calcio sérico disminuye notablemente por el tratamiento con pamidronato y la infección parasitaria, sin embargo, los murinos tratados sin infección pueden mostrar un leve incremento en esta variable después de 8 días de haber suspendido el tratamiento

- La ultraestructura renal se ve fuertemente afectada con el tratamiento por pamidronato, hecho que reafirma la toxicidad ocasionada por tratamientos con altas dosis de bisfosfonatos.

BIBLIOGRAFÍA

- ▶ **1.** Apt W., Aguilera X., Arribada A., Perez C., Miranda C., Sanchez G., 1998. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**: 133-138.

- ▶ **2.** Apt W., Arribada A., Zulantay I., Sanchez G., Vargas S.L., Rodriguez J., 2003. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **97**: 23-29.

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

- ▶ **4.** Arias J.F., Garcia F., Rivera M., Lopez R., 1997. *Trypanosoma evansi* in capibara from Venezuela. *J. Wildl. Dis.* **33**: 359-361.

- ▶ **5.** Arrabal M., Díaz F., Jiménez A., León V., Arrabal M. A. y Gómez A., 2007. Tratamiento de la litiasis con bisfosfonatos. *Arch. Esp. Urol.* **60**: 745-754.

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

- ▶ **7.** Bouzahzah B., Jelicks L.A., Morris S.A., Weiss L.M., Tanowitz H.B., 2005. Risendronate in the treatment of Murine Chagas' disease. *Parasitol. Res.* **96**: 184-187.

- ▶ **8.** Bozzola, J.J., Russell, L.D., 1992. Electron Microscopy. Specimen staining and contrast methods for transmission electron microscopy. Jones and Bartlett Publishers, Segunda Edición, Sudbury, Canada.

- ▶ **9.** Braga M.S., Lauria-Pires L., Argañaraz E., Nascimento R.J., Teixeira A.R., 2000. Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti- *Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **42:** 157-161.

- ▶ **10.** Brener, Z., 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **4:** 389-396.

- ▶ **11.** Britto C., Silveira C., Cardoso M.A., Marques P., Luquetti A., Macedo V., 2001. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **96:** 823-826.

- ▶ **12.** Brun R., Hecker H., Lun Z-H., 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Veterinary Parasitology* **79:** 95-107.

- ▶ **13.** Brusca R.C., Brusca G.J., 2003. *The Protist. Invertebrates.* Sinauer Associates, Segunda Edición, Sunderland, Inglaterra.

- ▶ **14.** Caffrey C.R., Scory S., Steverding D., 2000. Cysteine proteinases of trypanosome parasites: novel targets for chemotherapy. *Curr. Drug Targets* **1:** 155-162.

- ▶ **15.** Cañizares, M. E., Alvarez, M., 2008. Cuantificación de cationes en suero de ratones NMRI tratados con acrilamida o cianoacrilato de N-Butilo. *RETEL* **12:** 1-12.

- ▶ **15.** Castellanos J.J., Catalina C.J., Carmona A., 2002. *Anatomía Humana General.* Universidad de Sevilla Publicaciones, Segunda Edición, Sevilla, España.

- ▶ **16.** Cazzulo J., Stoka V., Turk V., 2001. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.* **7:** 1143-1156.

- ▶ **17.** Coppens, I., Courtoy P. J., 2000. The adaptive mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 129-156.

- ▶ **18.** Docampo R., 1990. Sensitivity of Parasites to Free Radical Damage by Antiparasitic Drugs. *Chem. Biol. Interactions.* **73**: 1-27.

- ▶ **19.** Docampo R., Moreno S.N., 1986. Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Fed. Proc.* **45**: 2471-2476.

- ▶ **20.** Docampo R., 2001. Recent developments in the chemotherapy of Chagas' disease. *Curr. Pharm. Des.* **7**: 1157-1164.

- ▶ **21.** Docampo R. y Moreno S., 2008. The Acidocalcisome as a Target for Chemotherapeutic Agents in Protozoan Parasites. *Curr. Pharm. Des.* **14**: 882-888

- ▶ **22.** Du X., Guo C., Hansell E., Doyle O.S., Caffrey C.R., Holler T.P., 2002. Synthesis and structure activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med. Chem.* **45**: 2695-2707.

- ▶ **23.** Dwight B., 2004. *Georgis Parasitología para Veterinarios*. ElSevier, Octava Edición, Madrid, España.

- ▶ **24.** Eckert, R., Randall, D. Y Agustine, G., 1999. *Fisiología Animal, Mecanismos y Adaptaciones*. Mc.Graw-Hill, Cuarta Edición, Madrid, España.

- ▶ **25.** Facer C.A., Molland E.A., Gray A.B., Jennings G.C., 1978. *Trypanosoma brucei*, renal pathology in rabbits. *Exp. Parasitol.* **44**: 249-261.

- ▶ **26.** Forlano M., Meléndez R., y Canelón J. L., 2011. Seropositividad a *Trypanosoma evansi* en caballos criollos infectados naturalmente en tres hatos del estado apure. *FCV-LUZ* **21**: 131-136

- ▶ **27.** Gardiner C.H., Fayer R., Dubey J.P., 1988. An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues. Armed Forces Institute of Pathology, Segunda Edición, Minesota, Estados Unidos.

- ▶ **28.** Ghadially F.N., 1997. Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix. Oxford University Printing. Cuarta Edición. Boston, Estados Unidos.

- ▶ **29.** Ginsburg, H. & Wolosin, J.M., 1979. Effects of uranyl ions on lipid bilayer membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **23**: 125-131.

- ▶ **30.** Godman G., 1990. Bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial Médica Panamericana, Octava Edición, Buenos Aires, Argentina.

- ▶ **31.** Green J.R., 2004. Bisphosphonates: preclinical review. *The Oncologist*. **9**: 3-13.

- ▶ **32.** Hernández J. L., Riancho J. A., Macías J. G., 2005. Bisfosfonatos intravenosos. *Med Clin (Barc)* **9**: 348-354.

- ▶ **33.** Hoare, C.A. 1964. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. *Journal of Protozoology* **11**: 200-207.

- ▶ **34.** Hoare, C. A., 1972. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications, Edición Ilustrada, Oxford, Estados Unidos.

- ▶ **35.** Jódar E., Martínez D., Segarra M.C., 2002. Efectos adversos y contraindicaciones de los bisfosfonatos. Rapado A, Díaz Curiel M, eds. Bisfosfonatos en las enfermedades del metabolismo óseo y mineral, pág. 113-122. FHOEMO. Madrid.

- ▶ **36.** Kotsikorou E., Song Y., Chan J., Faelens S., Tovian Z., Broderick E., Bakalara N., Docampo, R. Olfield., E., 2005. Biphosphonate inhibitor of the exopolyphosphatase activity of the Trypanosome brucei soluble vacuolar pyrophosphatase. *J. Med. Chem.* **48**: 6128-6139.

- ▶ **37.** Lauria-Pires L, Braga MS, Vexenat AC, Nitz N, Simoens-Barbosa A, Tinoco D.L., 2000. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **63**: 111-118.

- ▶ **38.** Litter, M., 1997. Compendio de Farmacología. El Ateneo, Cuarta Edición, Buenos Aires, Argentina.

- ▶ **39.** Losos, G.J. 1980. Diseases caused by *Trypanosoma evansi*. A review. *Veterinary Research Communications* **4**: 165-181.

- ▶ **40.** Luft, J. 1961. Improvements of epoxy resin embedding methods. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **9**: 409-414.

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

- ▶ **42.** Martin M.B., Grimley J.S., Lewis J.C., Heath H.T., Bailey B.N., Kendrick H., Yardley V., Caldera A., Lira R., Urbina J.A., Moreno S.N., Docampo R., Croft S.L., Oldfield E., 2001. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. *J. Med. Chem.* **44**: 909-916.

- ▶ **43.** Mendoza M., Mijares A., Rojas H., Rodriguez J.P., Urbina A., DiPolo R., 2002. Physiological and morphological evidences for the presence acidocalcisomes in *Trypanosoma evansi*: single cell fluorescence and ³¹P NMR studies. *Mol. Biochem. Parasitol.* **125**: 23-33.

- ▶ **44.** Mendoza M., Fernández D., González-Marcano E., Linares N., González R., González-Baradat B., 2008. Evaluación del efecto del risendronato sobre la tripanosomosis causada por *Trypanosoma evansi* en modelo experimental murino. *Entreciencias* **2**: 31-46.

- ▶ **45.** Menezes, V.T., Queiroz, A.O., Gomes, M.A., Marques, M.A., Jansen, A.M., 2004. *Trypanosoma evansi* in inbred and Swiss-webster mice: distinct aspects of pathogenesis. *Parasitology Research* **94**: 193-200.

- ▶ **46.** Millonig G.J., 1961. A modified procedure for lead staining of thin sections. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **32**: 736-739.

- ▶ **47.** Milton J. S., 2001. Estadística para Biología y Ciencias de la salud. Mc Graw-Hill Interamericana, Segunda Edición, Madrid, España.

- ▶ **48.** Montalvetti A., Bailey B.N., Martin M.B., Severin G.W., Oldfield E., Docampo R., 2001. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **276**: 33930-33937.

- ▶ **49.** Montalvetti A., Fernández A., Sander J.M. Ghosh S., Van Brussel E., Oldfield E., Docampo R., 2003. Farnesyl pyrophosphate synthase is an essential enzyme in *Trypanosome brucei*. *J. Biol. Chem.* **278**: 17075-17083.

- ▶ **50.** Peña G., 2000. Enfermedades Exóticas de los Animales. Editorial Instituto interamericano de cooperación para la agricultura, Segunda Edición, Virginia, Estados Unidos.

- ▶ **51.** Perrone T., Garríos J., Roschman-González., Tejero F., Escalante A., Aso P., 2006. Susceptibility of different Mouse strains to experimental infection with a venezuelan isolate of *Trypanosoma evansi*. *J. Protozool. Res.* **16**: 1-8.

- ▶ **52.** Reyna-Bello A., Garcia F., Rivera M., Sansó B., Aso P., 1998. Enzima-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. *Veterinary Parasitology* **80**: 149-157.

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

- ▶ **54.** Riancho JA, 2002. Bisfosfonatos en la prevención y tratamiento de la osteoporosis. En: Rapado A, Díaz Curiel M, eds. Bisfosfonatos en las enfermedades del metabolismo óseo y mineral. FHOEMO. Madrid.

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

- ▶ **56.** Rodrigues, A., Figuera, R. A., Souza, T.M., Schild, A.L., Soares, M.P., Milano J., Barro C.S.L., 2005. Surtos de tripanosomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. *Pesq. Vet. Bras.* **25**: 239-249.

- ▶ **57.** Rodriguez N., Bailey B.N., Martin MB., Docampo R., 2002. Radical cure of experimental cutaneous Leishmaniasis by the biphosphonate pamidronate. *J. Infectious Diseases* **186**: 138-140.

- ▶ **58.** Rosen L., Gordon D., Dugan W., Major P., Eisenberg P., Provencher L., Kaminski M., Simeone J., Seaman J., Chen B., Coleman R., 2003. Zoledronic acid is superior to pamidronate for the treatment of bone metastases in breast carcinoma patients with at least one osteolytic lesion. *Cncr.* **10**: 1002-1092

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

- ▶ **60.** Sakr E, El Din A, Ed-Mahdy MM, Abdel-Samme AM, El Heto IA., 1991. Pathological studies on tripanosomiasis in Egyptian camels. *Egyptian J. Comp. Clin. Pathol.* **4**: 245-254.

- ▶ **61.** Saldaña, C., Cordova, C., Ofelia, P., Vargas, V. 2006. Utilización de *Lepidium Peruvianum Maca*, como medio de cultivo para el crecimiento de *Trypanosoma Cruzi*. *Rev. Perú med. exp. Salud pública* **23**: 137-140.

- ▶ **62.** Sanchez R., 2008. Anemia y Cáncer. Aran Ediciones, Primera Edición, Madrid, España.

- ▶ **63.** Schwarzenbach G., 1955. The complexones and their analytical application. *Analyst* **80**: 713-729.

- ▶ **64.** Silveira C., Castillo E., Castro C., 2000. Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crias, na evolução da fase indeterminada. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **33**: 191-196.

- ▶ **65.** Silverthorn, D. U., 2008. Fisiología humana, Un enfoque integrado. Medica Panamericana, Cuarta Edición, Buenos Aires, Argentina.

- ▶ **66.** Sokal R.R., Rohlf F.J., 1981. C. WH Freeman and Company, Segunda Edición, New York, Estados Unidos.

- ▶ **67.** Srivastava R.V., Malhotra M.N., Iyer P.K., 1969. Pathology of experimental *Trypanosoma evansi* in dogs. *Indian J. Anim. Sci.* **39**: 307-314.

- ▶ **68.** Stoppani A.O., 1999. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)* **59**: 147-165.

- ▶ **69.** Suryanarayana C., Gupta S.L., Singh R.P., Sadana J.R., 1986. Pathological changes in donkeys (*Equus asinus*) experimentally infected with *T. evansi*. *Indian Vet. Med. J.* **6**: 57-59.

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

- ▶ **71.** Tejero F., Brun S., Roschman-González A., Velasco E., Aso P.M., Finol H.J., 2009. Ultraestructura renal en infecciones murinas experimentales con un aislado venezolano de *Trypanosoma evansi*. *Revista del INHRR* **40**: 44-49.

- ▶ **72.** Tewari A.K., Rao J.R., Mishra A.K., 2009. Identification of cysteine protease derived from *Trypanosoma evansi*. *Journal of Veterinary Parasitology* **23**: 455-461

- ▶ **73.** Thomas D.B., Franceschini N., Hogan S.L., Ten Holder S., Jennette C.E., Falk R.J., Jennette J.C., 2006. Clinical and pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants. *Kidney Int.* **69**: 920-926.

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

- ▶ **75.** Torregrosa J.V., Ramos A.M., 2010. Uso de bisfosfonatos en la enfermedad renal crónica. *Nefrología* **30**: 288-296

- ▶ **76.** Uche U.E., Jones T.W., 1992. Pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in rabbits. *J. Comp. Pathol.* **106**: 299- 309.

- ▶ **77.** Urbina J., Moreno B., VierkotterS., OldfieldE., Payares G., Sanoja C., Bailey B., Yan W., Scott D., Moreno S., Docampo R., 1999. *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth *in vitro* and *in vivo* is blocked by pyrophosphate analogs. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 33609–33615.

- ▶ **78.** Urbina J.A., 2002. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 287-295.

- ▶ **79.** Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Lira , Romanha AJ., 2003. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int. J. Antimicrobl. Agents* **21**: 27-38.

- ▶ **80.** Urbina J.A., Docampo R., 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* **19**: 495-501.

- ▶ **81.** Valera Z., Parra O., Alvarado M., Barboza G., Escalona F., Ramírez R., 2005. Effect of Experimental *Trypanosoma vivax* Infection on Hematological Parameters in Sheep. *Revista Científica FCV-LUZ* **15**: 412-420.

- ▶ **82.** Van Marck E.A., Verboot T., 1980. *Trypanosoma brucei* detection of antigen deposits in glomeruli of mice vaccinated with purified variable antigen. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**: 666-667.

- ▶ **83.** Vickerman K., 1977. The diskynetoplasty mutation in *Trypanosoma evansi* and other flagellates. *Protozoology* **3**: 57-69.

- ▶ **84.** Watson M.L., 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **4**: 475-478.

- ▶ **85.** Yamaguchi K., Motegi K., Iwakura Y., Endoy Y., 2000. Involvement of interleukin-1 in the inflammatory actions of aminobisphosphonates in mice. *British J. Pharmacol.* **130**: 1646-1654.

- ▶ **86.** Yardley, V., Khan, A., Martin, M., Slifer, T., Araujo, F., Moreno, S., Docampo, R., Croft, S., Olfield, E., 2002. In vivo activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**: 929-931.

Referencias Electrónicas

- ▶ <http://www.fao.org/> (Consulta: 2 de febrero de 2011)
- ▶ www.cpap.embrapa.br (Consulta: 5 de febrero de 2011)
- ▶ <http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html> (Consulta: 3 de febrero de 2011)