



UNSAM
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INGENIERÍA AMBIENTAL

***Desarrollo de biomarcadores de presencia y de efectos laterales tóxicos
de los fármacos antichagásicos Nifurtimox y Benznidazol***

Trabajo de Tesis para optar por el título de
Doctor en Ciencia y Tecnología Mención Química

Por: ***Romina Fernanda Bulffer***

Director de Tesis: Dr. José Alberto Castro

Co-directora: Dra. Silvia Laura Fanelli

Lugar de Trabajo: Centro de Investigaciones Toxicológicas (CEITOX-UNIDEF,
MINDEF-CONICET)

- 2012 -

RESUMEN

En la primera parte de este trabajo de tesis se desarrollaron y validaron dos metodologías accesibles para la determinación de los antichagásicos Bz y Nfx en sangre completa de rata. Una por espectrofotometría UV-Visible, fácilmente disponible en laboratorios de baja complejidad y otra por HPLC-DAD

Los procedimientos descritos en materiales y métodos resultaron ser reproducibles, exactos, precisos, sensibles y confiables. La metodología descrita fue utilizada para la determinación de los niveles de Bz o Nfx presentes en sangre completa de rata luego de la administración oral del antichagásico y a distintos tiempos de intoxicación (1, 3, 6 y 24 horas). En ambos casos hubo absorción inmediata. La presencia temprana tanto de Nfx como de Bz fue evidenciada ya a una hora de la administración oral.

Los niveles máximos de antichagásicos en sangre se observaron a las 3 horas de la administración, decreciendo hasta niveles mínimos y/o no detectables a las 24 horas.

En el caso del Bz adicionalmente, se estudiaron los niveles del mismo en sangre de ratas de distintas edades (14, 21, 70 días de edad) tratadas con una dosis de 100 mg/kg de la droga. Los niveles de Bz en sangre completa luego de 1, 3, 6 y 24 horas de la administración del antichagásico, en las ratas de 14 días de edad, fueron significativamente mayores y se mantuvieron por un tiempo más prolongado (24 horas), que en las ratas de 21 ó 70 días de edad. Ello concuerda con la menor capacidad microsomal hepática de metabolizar al Bz comparada con la rata adulta.

En una segunda parte de esta tesis se estudiaron posibles biomarcadores de efecto. En estudios preliminares se observó que la administración de Nifurtimox y Benznidazol aumentaba significativamente la formación de productos indicadores de estrés oxidativo tales como emisión de quimioluminiscencia o formación de hidroperóxidos sanguíneos.

En la quimioluminiscencia inducida por *t*-BHP en plasma de ratas tratadas con Nfx, se observó una respuesta significativamente mayor a la hora de la administración,

comparadas con las ratas control, mientras que en el caso de Bz se observó una diferencia significativa a las 3 horas.

El ensayo de XO mostró un nivel mayor de lipohidroperóxidos en ratas tratadas con Nfx o Bz a la 1, 3 y 6 horas después del tratamiento.

Los aquí descritos biomarcadores de presencia y de efecto perjudiciales del Nfx y el Bz accesibles en la clínica, podrían ser razonablemente utilizados en estudios futuros para detectar de manera temprana sus consecuencias tóxicas dañinas deletéreas y para desarrollar coadyuvantes útiles que prevengan los efectos secundarios tóxicos de ambos antichagásicos.

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Carlos Chagas y el Descubrimiento de una Nueva Enfermedad.	2
2. Ciclos del Parásito y Formas de Infección, desde el Véctor hasta el Huésped.	5
3. Drogas Probadas para el Tratamiento de la Enfermedad de Chagas.	
Introducción del Nifurtimox y Benznidazol.	9
4. Cómo se Diagnostica la Enfermedad en los Diferentes Estadios.	18
4.1 Fase Aguda.	19
4.2 Fase Indeterminada.	21
4.3 Fase Crónica.	23
5. Tratamiento.	32
6. Situación Actual de la Enfermedad en América Latina.	36
II. OBJETIVOS	64
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	66
1. Materiales.	67
1.1 Animales.	67
1.2 Reactivos.	68
1.3 Equipos Utilizados.	69

2. Métodos.	70
2.1 Preparación de la Columna.	70
2.2 Obtención de muestras de Sangre	70
2.3 Validación del Método Analítico.	71
A. Especificidad.	73
B. Linealidad.	73
B1. Metodología.	73
B2. Criterios de Aceptación.	74
C. Precisión.	74
C1. Metodología.	74
C2. Criterio de Aceptación.	75
D. Exactitud.	75
D1. Metodología.	75
D2. Criterio de Aceptación.	77
E. Rudeza.	77
E1. Metodología.	77
E2. Criterios de Aceptación.	77
F. Robustez.	78
F1. Metodología.	78
F2. Criterios de Aceptación.	78

G. Intervalo (Rango).	78
2.4 Xylenol Orange	79
A) Procedimiento.	81
B) Curva de Calibración del <i>t</i> -Butilhidroperóxido (TBHP).	83
2.5 Quimioluminiscencia.	83
A) Procedimiento.	88
B) Tratamiento Estadístico de los Datos.	89
IV. RESULTADOS	90
1. Validación de la Metodología para la Determinación de Benznidazol y Nifurtimox en Sangre por Espectrofotometría UV-Visible.	91
1.1 Especificidad.	91
1.2 Linealidad.	92
1.3 Exactitud, Repetitividad y Reproducibilidad.	94
1.4 Robustez.	96
2. Validación de la Metodología para la Determinación de Benznidazol y Nifurtimox en Sangre por HPLC-DAD.	97
2.1 Especificidad.	97
2.2. Linealidad.	100
2.3 Exactitud, Repetitividad y Reproducibilidad.	102

2.4 Robustez.	103
3. Biomonitorio de las Drogas en Sangre.	105
4. Biomarcadores de Efecto.	108
4.1 Quimioluminiscencia.	108
4.2 Xylenol – Orange.	112
V. DISCUSIÓN	114
VI. CONCLUSIONES	121
VII. BIBLIOGRAFÍA	124
VIII. ABREVIATURAS	131
IX. APÉNDICE	133