

PARASITEMIA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN *MUS MUSCULUS* Y ESTUDIO PRELIMINAR IN VITRO DE LA ACCIÓN TRIPANOCIDA DE DOS ESPECIES DE CALCEOLARIA DEL PERÚ, AÑO 2009

PARASITEMY OF *TRYPANOSOMA CRUZI* IN *MUS MUSCULUS* AND PRELIMINARY IN VITRO STUDY OF THE TRYPANOCIDAL ACTION OF TWO SPECIES OF CALCEOLARIA IN PERU, YEAR 2009

Enrique León¹, Zoila Guillén², Luis Miguel Félix³, Juana Chávez⁴, Rosa Martínez⁵

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el fin de evaluar la acción tripanocida de los extractos de dos especies de *Calceolaria* (códigos 17664 y 17665). En ratones de laboratorio, el pico máximo de parasitemia por inoculación intraperitoneal, se consiguió a los 19 y 26 días. Luego, se procedió al análisis in vitro; se utilizó para ello una lámina excavada y el extracto de cada una de las especies de *Calceolaria*, a concentraciones de 0.05 y 0.01 mg, y gotas de sangre. Se registró que la segunda concentración producía una lisis total de los *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) con la *Calceolaria* 17665, no así con la *Calceolaria* 17664, que los destruía en un 50%.

Palabras clave: Calceolaria, *Trypanosoma cruzi*, acción tripanocida.

ABSTRACT

The following research was aimed at evaluating the action of tripanocidal of the extracts of two species of *Calceolaria* (codes 17664 and 17665). In experiments performed in laboratory mice, the maximum peak of intraperitoneal inoculation was achieved during the 19th and 26th day.

Later, we proceeded to in vitro analysis, for which we used an excavated lamina and the extract of each and every single of the species of *Calceolaria*, at concentrations of 0.05 and 0.01 mg, and blood drops. It was recorded that the second concentration produced a total lysis of the *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) with *Calceolaria* 17665, now with *Calceolaria* 17664, which destroyed them by 50%.

Key words: Calceolaria, *Trypanosoma cruzi*, tripanocidal action.

-
- 1 Decano de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Norbert Wiener.
 - 2 Doctora en Ciencias Biológicas. Docente de la Universidad Norbert Wiener.
 - 3 Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos. Docente de la Universidad Norbert Wiener.
 - 4 Magíster en Farmacología. Docente de la Universidad Norbert Wiener.
 - 5 Bióloga. Docente de la Universidad Norbert Wiener.

1. INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiosis americana o enfermedad de Chagas, descubierta hace 100 años por Carlos Chagas, en Brasil, es una infección parasitaria producida por el protozoo *T. cruzi*, y vectorizado por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae, nominados chirimacha en el sur del Perú y chinche de caballo en el norte del mismo. Tiene como reservorios a los humanos y animales mamíferos.

Según la OMS¹, en Latinoamérica, 90 millones de personas están en riesgo de infectarse con *T. cruzi* y de 16 a 18 millones ya están infectadas.

La antigüedad de la infección humana por *T. cruzi* en el Perú data desde la época incaica, de acuerdo al examen realizado en Italia sobre una momia peruana.² Según Náquira y Cabrera, Escomel en 1917 encontró al vector *Triatoma infestans* en los valles de la zona sudoccidental del Perú; los mismos autores refieren que la infección humana estaría en la zona sudoccidental, en las regiones de Arequipa, Moquegua y Tacna; en el norte, en las regiones de La Libertad, Lambayeque, Tumbes y Piura; y en la zona nororiental, en las regiones de Cajamarca, Amazonas, San Martín y Loreto.³

En los últimos tres años, en la región amazónica del Perú, la red de laboratorios del Instituto Nacional de Salud (INS) y la Dirección General de Epidemiología (DGE), han detectado siete casos agudos de la enfermedad de Chagas.^{4,5,6} A pesar de la antigüedad del descubrimiento de esta enfermedad, no hay estudios evidentes que reporten la verdadera magnitud de la infección en el Perú.

1.1. Fases de la enfermedad

Se conocen estas formas clínicas: fase aguda, fase subaguda o indeterminada y fase crónica. En la Fase aguda la sintomatología se presenta en un 5%. Es grave generalmente en niños; el signo y síntoma más notorio es la fiebre y el signo de Romaña. En esta fase, el estadio evolutivo del parásito es el tripomastigote en sangre circulante y nidos de amastigote en tejido muscular. Según Vega y colaboradores, en la Amazonía la fiebre es el síntoma más frecuente en un 20%.⁴

En la fase subaguda o indeterminada hay ausencia de signos y síntomas; el diagnóstico se realiza mediante pruebas serológicas. La fase crónica se caracteriza por la presencia de cardiopatía chagásica y las megaformaciones; estas manifestaciones se presentan después de entre 10 y 15 años del contacto con el agente etiológico.

1.2. El parásito

Es un protozoo flagelado con 3 formas evolutivas: tripomastigote, amastigote y epimastigote. El tripomastigote mide 20 micras; es fusiforme y toma la forma de "S" o de "C", se halla en la sangre circulante. Cuando está en el intestino posterior del vector, recibe el nombre de tripomastigote metacíclico. El amastigote mide de 2 a 4 micras; y se encuentra formando nidos en los tejidos. El epimastigote mide 20 micras; está presente en el intestino del vector y es la forma de multiplicación del parásito en el intestino medio del vector y en el medio de cultivo.

Existe variedad de cepas del *T. cruzi*, que constituyen poblaciones policlonales aisladas en pacientes, animales y vectores.³

1.3. El reservorio

El reservorio de la enfermedad puede ser el humano y los animales mamíferos domésticos y silvestres; el principal reservorio en el Perú es el *Cavia porcellus*, cuyo cobayo. En las zonas endémicas el humano es el reservorio de la infección; es infectado por contacto con la heces del vector, por transfusión sanguínea, por vía transplacentaria o por trasplante de órganos.

1.4. El vector

Se constituye de insectos hemípteros de la subfamilia Triatominae; son hematófagos (con piezas bucales de 3 segmentos rectos), de hábitos nocturnos, intradomiciliarios, peridomiciliarios y silvestres. Viven en las grietas de las paredes de las viviendas, en los techos de paja, en los corrales de animales alledaños a las viviendas, en los nidos de aves y en los troncos de árboles. Su fuente alimenticia está constituida por sangre de mamíferos y aves. En el Perú existen 19 especies, las principales, *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *Panstrongylus chinai*, *P. geniculatus*, *P. herreri*, *Rhodnius robustus*, *R. pictipes*, *R. ecuadoriensis* y *Eratyrus mucronatus*, en quienes se ha encontrado infección natural con *T. cruzi*. Estos vectores están distribuidos en veintitrés regiones; solo en Huancavelica no se ha encontrado aún.^{7, 8, 9, 10}

1.5. Prevención

Para prevenir esta infección se tiene que tener en cuenta varios aspectos: mejoramiento de la vivienda, sociabilización del problema de la enfermedad, control del vector, vigilancia epidemiológica, control en los bancos de sangre para la transfusión sanguínea y control en el trasplante de órganos.

En América Latina se ha acordado por despistaje de la infección, en donantes de los bancos de sangre. Según Schmunis, la migración de latinoamericanos a otras partes del mundo ha ocasionado casos de Chagas por transfusión sanguínea y trasplante de órganos.¹¹

1.6. Tratamiento

El MINSA ofrece tratamiento gratuito de acuerdo a un protocolo. No existen publicaciones sobre el tratamiento mismo. Hasta el presente el tratamiento efectivo lo constituyen el nifurtimox (nombre comercial Lampit) y el benznidazol (nombre comercial Rochagan).¹² Apt utiliza el itraconazol o allopurinol si la enfermedad no tiene mucho tiempo de evolución.¹³

1.7. Las plantas del género *Calceolaria*

El género *Calceolaria* pertenece a la familia Scrophulariaceae; supone quinientas especies, distribuidas en Nueva Zelanda, Centroamérica y Sudamérica. Aquí se conocen aproximadamente doscientas especies; en el Perú existen ciento cincuenta y nueve especies, distribuidas en varias regiones. Crecen entre los 2000 y los 4000 msnm. El nombre genérico deriva de Calceolus, debido a que la flor tiene el labio inferior calceiforme, por lo que se les conoce vulgarmente como zapatito, capacho o botita.

Algunas especies de *Calceolaria* poseen naftoquinonas, las que han mostrado propiedades antichagásicas, antitumorales y antiinflamatorias.¹⁴ En Chile se les conoce con los nombres vulgares de capachito, topa-topa y zapatito; y se les utiliza en medicina popular como agente bactericida, cicatrizante, tónico estomacal y edulcorante.¹⁵

En las dos últimas décadas se ha aislado alrededor de ochenta y cinco nuevos diterpenos de seis tipos de esqueletos y seis bis-diterpenos unidos por enlace malónico. El aislamiento de nuevas estructuras diterpénicas ha abierto un nuevo campo de estudios de la *Calceolaria* para su aplicación.^{16,17,18,19}

Hay ciento veintiún especies de *Calceolaria* en el Perú; de ellas, ciento uno son endémicas; la mayoría, del género *Calceolaria*.²⁰

2. OBJETIVOS

Los objetivos del estudio son los siguientes:

1. Determinar la curva de parasitemia en animales de experimentación *Mus musculus*, de la cepa Swiss.
2. Observar el aspecto clínico en los ratones infectados con *T. cruzi*.
3. Evaluar in vitro la acción tripanocida de los extractos de dos especies de *Calceolaria* (códigos 17664 y 17665).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Determinación de la curva de parasitemia en ratones

Para la infección experimental se utilizaron *Mus musculus* machos, cepa Swiss, de 1- 1 ½ mes de nacidos y con 18-20 gramos de peso.

La cepa de *T. cruzi* que utilizamos procede del sur del Perú (Arequipa).

Los ratones fueron inoculados por vía intraperitoneal con 0,1 ml de heces de *Triatoma infestans* diluidas en suero fisiológico estéril con tripomastigotes meta cíclicos.

La infección de los ratones fue evaluada de modo interdiario desde el día 7 hasta el día 36 mediante observación microscópica de una gota de sangre obtenida de su cola. Para el conteo de los *T. cruzi* se utilizó una cámara de Neubauer.

3.2. Observación del estado clínico

Se realizó la observación interdiaria de los ratones, al tiempo que la evaluación de la curva de parasitemia en sangre.

3.3. Prueba in vitro

Se siguió el siguiente protocolo:

Extracto de *Calceolaria* con códigos 17664 y 17665.

Se utilizó 100 mL de solución salina fisiológica estéril (SSF) en cada pozo, para diluir el extracto de *Calceolaria* y para el control.

Luego, se agregó 3 gotas de sangre con tripomastigotes de *T. cruzi*.

TABLA 1

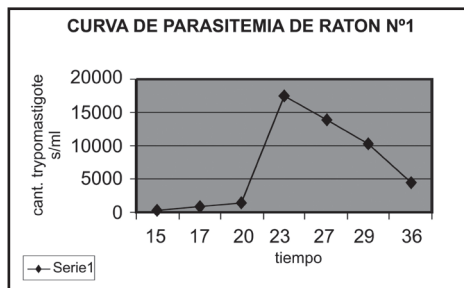
SSF Control	Extracto	de	<i>Calceolaria</i>	en mL
	0,01	0,02	0,03	0,04
	0,01	0,02	0,03	0,04

4. RESULTADOS

4.1. Curvas de parasitemia

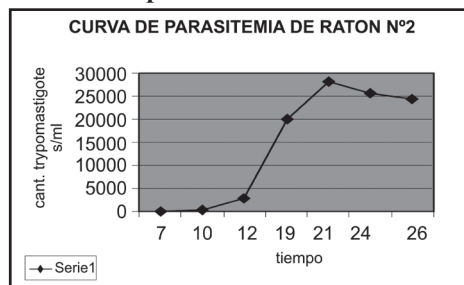
Presentamos la curva de parasitemia de 3 ratones.

GRÁFICO 1
Curva de parasitemia de ratón N°1



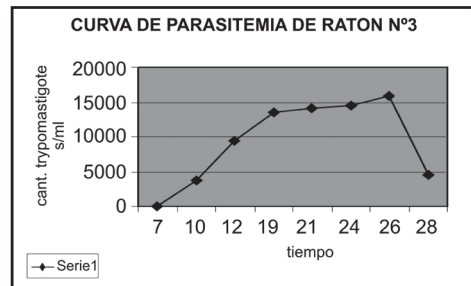
En el gráfico N° 1 se observa que en el ratón la parasitemia se inició a los 15 días, y que llegó a su máximo desarrollo entre los 21-23 días; declinó posteriormente.

GRÁFICO 2
Curva de parasitemia de ratón N°2



En el ratón N° 2 se observa que la parasitemia empieza a aumentar a partir de los 12 días, y que llega al máximo entre 19-21 días.

GRÁFICO 3
Curva de parasitemia de ratón N°3



En el ratón N° 3 se observa que la parasitemia empieza en el día 7 de inoculación; aumenta hasta el día 19, y se mantiene estable hasta el día 24; además, alcanza la máxima parasitemia a los 26 días, para luego decaer.

4.2. Resultado del experimento in vitro de dos cepas del extracto de *Calceolaria*

Como se puede observar, en la prueba realizada por duplicado se obtuvo igual resultado, con la muerte de los Tripomastigotes de *T. cruzi*, a los 15 minutos en la concentración de 0.01 mg

TABLA 2

Calceolaria con código 17664 por duplicado

SSF Control	Extracto	de	<i>Calceolaria</i>	en mg
Vivos con mucho movimiento hasta 2 horas	0,01 Mueren a los 15 minutos	0,02 Mueren inmediatamente	0,03 Mueren inmediatamente	0,04 Mueren inmediatamente
Vivos con mucho movimiento hasta 2 horas	0,01 Mueren a los 15 minutos	0,02 Mueren inmediatamente	0,03 Mueren inmediatamente	0,04 Mueren inmediatamente

TABLA 3
Calceolaria con código 17665 por duplicado

SSF Control	Extracto	de	Calceolaria	en mg
Vivos con mucho movimiento hasta 2 horas	0,005 A los 30 minutos siguen vivos el 50 %; y mueren totalmente a los 90 min.	0,01 Mueren inmediatamente	0,02 Mueren inmediatamente	0,03 Mueren inmediatamente
Vivos con mucho movimiento hasta 2 horas	0,005 A los 30 minutos siguen vivos el 50 %; y mueren totalmente a los 90 min.	0,01 Mueren inmediatamente	0,02 Mueren inmediatamente	0,03 Mueren inmediatamente

de *calceolaria*. A partir de 0,02 mueren automáticamente al entrar en contacto con el extracto.

Se observa que la cepa con código 17665 es más eficaz: los *Trypomastigotes* mueren inmediatamente en la concentración de 0,01 mg. En la concentración de 0,005 mg, a los 30 min disminuyen en un 50%; el resto permanece vivo hasta los 90 min.

5. DISCUSIÓN

Los ratones (3) infectados con *T. cruzi* presentaron un comportamiento similar entre sí en cuanto a la parasitemia. Esta apareció a los días 7, 10 y 15, en estos tres ratones; y llegó a un máximo desarrollo entre los 19 y 26 días. En otros experimentos que hemos realizado, aparece la parasitemia en el día 7.

En una cepa procedente de Tiabaya, Arequipa⁽²¹⁾, se observó que el pico máximo llega a los 29 días (comparar con las tablas 1, 2 y 3). Para con la cepa Tulahuen de *T. cruzi*, Zúñiga *et al.* mencionan que la parasitemia más alta se da en los ratones machos entre los 13 a 17 días, mientras que en la hembra la parasitemia es baja; y hallan que el pico

máximo de parasitemia está relacionado con la cepa y con el sexo.²²

En nuestro experimento utilizamos ratones machos, los que presentaron también una alta parasitemia. Para evaluar la acción tripanocida del extracto de la *Calceolaria* era importante conocer el pico más alto de la parasitemia, puesto que esto nos sirvió para hacer el estudio *in vitro* y nos servirá para hacer el estudio *in vivo*.

En la evaluación *in vitro* del extracto de *Calceolaria* con código 17665, se observó eficacia: los *trypomastigotes* de *T. cruzi* se lisan inmediatamente en la concentración de 0,01 mg. Es diferente la *Calceolaria* con código 17664, que en la misma concentración permite que los *trypomastigotes* de *T. cruzi* permanezcan vivos hasta los 15 minutos (Ver tablas 4 y 5).

Ambrozin *et al.*²³, en trabajos realizados con otras plantas de acción tripanocida, observaron lo siguiente: los componentes químicos que actúan probablemente en la lisis celular, son el dichloromethane evaluado en *Almeidea coerulea*, ethyl acetate en *Conchocarpus heterophyllus*, y en *Galipea carinata* el dichloromethane y hexano. De ellos, el más activo fue *C. heterophyllus*: se conside-

ra rico en componente tripanocida, en un 99,22% con el extracto crudo y en 100% con el principio activo.

6. CONCLUSIONES

1. De la infección experimental en ratones se concluye que la parasitemia se inicia entre los 7 y 15 días; alcanza el máximo pico de parasitemia entre los 19 y 26 días; y declina después.
2. Se observa que los ratones inoculados clínicamente se erizan, son inapetentes y disminuyen en su actividad.
3. El extracto crudo de *Calceolaria* con código 17665 produce lisis celular inmediatamente en un 100% de los Tripomastigotes de *T. cruzi*, considerándose buena actividad tripanocida.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. "World Health Organization. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee". *Technical Report Series*, N.º 905. Geneva: WHO; 2002.
2. Fornaciari G, Castagna M, Viacava P, Tognetti A, Bevilacqua G, Segura EL. Chagas' disease in Peruvian Inca mummy. *Lancet*. 1992; 339(8785): 128-29.
3. Náquira C, Cabrera R. "Breve Reseña Histórica de la Enfermedad de Chagas, a cien años de su Descubrimiento y Situación en el Perú". *Rev. Perú Med Exp Salud Pública*. 2009; 26(4): 494-504.
4. Cabrera R, Vega S, Valderrama Y, Cabanillas K, Fernández C, Rodríguez O, et al. "Probable emergencia de la enfermedad de Chagas en la Amazonía peruana: reporte de 5 casos agudos en Datem del Marañón, Loreto (2006-2009)". En *Abstract Book Colloquium Neglected Tropical Disease of Latin America*, 2009, Lima, Peru. p.73.
5. Asayag CR, Garay CR, Sánchez GM, Angeles CC, Baca CJ, Evans C, et al. "Eight year old with fever, hepatomegaly, and positive thick smear". *Am J Trop Med Hyg*. 2008; 79(4): 473.
6. Vega S, Mendoza A, Cabrera R, Cáceres GA, Campos E, Ancca J, et al. "Primer caso de enfermedad de Chagas aguda en la selva central del Perú: Investigación de colaterales, vectores y reservorios". *Rev. Perú Med Exp Salud Pública*. 2006; 23(4): 288-92.
7. Guillén Z, Cáceres I, Elliot A, Ramirez J. "Triatomines del norte peruano y su importancia como vectores de *Trypanosoma* sp." *Rev. Per Ent*, 1989; 31: 25-30.
8. Guillén Z, Cáceres I, Elliot A, Ramírez J. "Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) de la zona centro del Perú". *Rev. Per Med Trop*. UNMSM. 1992a, 6:89-91.
9. Guillén Z, Cáceres I, Elliot A, Ramírez J. Distribución geográfica de los triatomines en el Oriente del Perú. 1992b, 6:93-97.
10. Guillén Z, Calderón G, Pareja E, Romero G, Valencia M. "Vectores de la Enfermedad de Chagas y su distribución geográfica en el Sur del Perú". *IV Congreso Peruano de Parasitología*. 2000. Libro de Res., pág. 181.
11. Schmunis G. "Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration". *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102 (Suppl.1): 75-86.
12. Perú, Ministerio de Salud. *Doctrina, Normas y Procedimientos para el control de la Tripanosomiasis o Enfermedad de Chagas en el Perú*. Lima: Dirección General de Salud de las Personas. Ministerio de Salud; 1998. Lima. Perú.
13. Apt W, Aguilera X, Arribada A, Pérez C, Miranda C, Sánchez G, Zulantay I, Cortés P, Rodríguez J, Juri D. "Treatment of Chronic Chagas's disease with Itraconazol and Allopurinol". *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1998; 59(1): 133-138.
14. Morello A, Pavani M, Garvarino JA, Chamy MC, Frey J, Mancilla J, Guerrero A, Repetto Y, Ferreira J. "Effects and mode of action of 1,4-Naphtoquinones isolated from *Calceolaria sessilis* on Tumoral Cells and *Trypanosoma* parasites", *Compar. Biochem. Physiol.*, 1995; 112:119-128.
15. Actividades 1982. Laboratorio Química Productos Naturales. Universidad Técnica Federico Santa María, departamento de Química. 2003; 70 pp.
16. Chamy MC, Piovano M, Garbarino JA, Vargas C. "Diterpenoids from *Calceolaria dentata*", *Phytochemistry*. 1995; 40: 1751-1754.

17. Chamy MC, Piovano M, Garbarino JA, Hernández C. "Diterpenoids from *Calceolaria pseudoglandulosa*". *Bol Soc. Chil Quím.* 1998; 43: 241-245.
18. Chamy MC, Piovano M, Garbarino JA, Paz Amèstica M. "Diterpenoids from *Calceolaria glandulifera*". *Phytochemistry.* 1998; 49: 2595-2597.
19. Garbarino J, Chamy M, Piovano M. "Chemistry of the *Calceolaria* genus. Structural and Biological Aspects". *Molecules* 2000. 2000; 5:302-303.
20. Salinas R, León B. "Calceolariaceae endémicas del Perú". *Rev. Perú. biol.* Número especial 2006; 13(2):220s- 236s.
21. Suárez N, Cabrera R, Cartagena L, Rolando A. "Características biológicas de una cepa de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino y análisis de supervivencia". *Rev. Perú. med. exp. Salud pública,* 2009, 26(2):187-192. ISSN 1726-4634.
22. Zuñiga C, Adriana Parra M, Vela H, Courcelles M, Vargas R. y Vergara U. "Estudio Histopatológico en ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*". *Parasitol al día,* 1998; 22: 1-2.
23. Ambrozín AR, Vieira PC, Batista J, Gracias F. da Silva M, "Albuquerque S. trypanocidal activity of Meliaceae and Rutaceae plant extracts". *Mem Inst. Oswaldo Cruz,* Río de Janeiro, 2004; 99(2): 227-231.