

ARTICULO ORIGINAL

Determinación de la sensibilidad *in vitro* de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* al benznidazol y al extracto de hoja de la planta *Zanthoxylum chiloperone***Determination of the *in vitro* sensitivity of different *Trypanosoma cruzi* strains to benznidazole and the leaf extract of the plant *Zanthoxylum chiloperone*****Hamuy R^I, *Acosta N^{II}, López E^{II}, Ferreira ME^{II}, Vera de Bilbao N^{II}**^ISanatorio La Costa, Asunción, Paraguay^{II}Departamento de Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay**RESUMEN**

Se evaluó la sensibilidad *in vitro* al benznidazol y al extracto de hojas de la planta *Zanthoxylum chiloperone* de diez cepas del *Trypanosoma cruzi*. Se utilizaron formas epimastigotas de las cepas, pertenecientes a diferentes linajes, diferente procedencia geográfica, incluidas tres de Paraguay, y aisladas de hospederos distintos, abarcando humanos, triatomíneos y animales silvestres. El grado de sensibilidad a la droga y al extracto vegetal fue estimado por el porcentaje de lisis de los parásitos a las 24 y 48 horas de exposición. Se observó un amplio rango de variación en el porcentaje de lisis entre las cepas, de 22,2% a 90,8% a la concentración del benznidazol de 200 µg/mL, con el hallazgo de una cepa con sensibilidad nula al mismo. Con respecto al extracto vegetal, tres concentraciones fueron testadas, de 500, 700 y 900 µg/mL, observándose variaciones en los porcentajes de lisis entre las cepas con las dos primeras concentraciones, entre un 2,1% y 100%, con lisis total en todas las cepas a la concentración de 900 µg/mL. No se observó asociación entre la diversidad de respuesta a los compuestos y la clasificación de las cepas ni con su origen geográfico y tipo de hospedero. Estas diferencias observadas resaltan la heterogeneidad de las poblaciones naturales del *T. cruzi*, aspecto importante a tener en cuenta en los estudios de sensibilidad a quimioterapéuticos y en los tamizajes primarios de nuevos antichagásicos. Así mismo, se destaca la eficacia del extracto vegetal sobre diferentes cepas de este parásito.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, benznidazol, *in vitro*, sensibilidad, *Zanthoxylum chiloperone*.

ABSTRACT

The *in vitro* sensitivity of ten *Trypanosoma cruzi* strains to benznidazole and the leaf extract of the plant *Zanthoxylum chiloperone* was evaluated. Epimastigotes forms of strains that belonged to different lineages, different geographic origin, including three from Paraguay and isolated from different hosts (humans, triatomines, wild animals) were used. The degree of sensitivity to the drug and vegetal extract was estimated by the lysis percentage of the parasites at 24 and 48 hs of exposure. It was observed a wide range of variation in the lysis percentages between strains from 22.2% to 90.8% at a benznidazole concentration of 200 µg/mL, finding a strain without sensitivity to the drug. In relation to the vegetal extract, three concentrations were tested, 500, 700 and 900 µg/mL,

*Autor correspondiente: **Dra. Nidia Acosta**, Dpto. de Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. Río de la Plata y Lagerenza, Asunción, Paraguay.
Email: nidacostag@gmail.com. medicinatropical@iics.una.py.

Fecha de recepción: febrero 2013; Fecha de aceptación: octubre de 2013

observing variations in the lysis percentages between strains with the two first concentrations, between 2.1% and 100%, and with total lysis in all strains at the concentration of 900 µg/mL. Association was not observed between the diversity of responses to the compounds and the strain classification, geographic origin and host type. The observed differences emphasize the heterogeneity of the natural populations of *T. cruzi*, an important aspect to be considered in the sensitivity studies of chemotherapeutics and in the primary screenings of new antichagasic drugs. It should also be remarked the efficacy of the vegetal extract on different strains of this parasite.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, benznidazole, *in vitro*, sensitivity, *Zanthoxylum chiloperone*.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una antropo-zoonosis producida por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi*, descrita por primera vez en 1909 por Carlos Chagas, en Minas Gerais, Brasil (1). Es la cuarta enfermedad tropical más importante de América del Sur, solamente superada por malaria, tuberculosis y esquistosomiasis (2).

La distribución de esta enfermedad abarca desde el sur de Estados Unidos de América hasta el sur de la Argentina y Chile (3).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la tripanosomiasis americana continúa siendo la mayor carga de morbi-mortalidad de origen parasitario en el continente americano, a pesar de importantes avances en el control (2,4).

La enfermedad es transmitida a los seres humanos por insectos hematófagos de la familia Triatominae. La transmisión también es posible por medio de transfusiones de sangre de personas infectadas, por infección congénita, trasplantes de órganos o por accidentes de laboratorio (5).

Se cree que el pleomorfismo natural de su agente causal, el *Trypanosoma cruzi*, podría influir significativamente en las diferencias observadas en cuanto a la severidad de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, en las diferentes regiones geográficas. Métodos de caracterización morfológica, bioquímica y/o molecular han sido empleados para agrupar y caracterizar las diversas poblaciones de este parásito y los resultados de estas investigaciones han sido empleados en estudios clínicos y epidemiológicos. Utilizando diferentes marcadores moleculares, las poblaciones de este parásito han sido recientemente clasificadas en seis unidades taxonómicas discretas (UDTs), denominadas: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI (6,7). Los parásitos de cada grupo están genéticamente más relacionados entre sí que con los de otro grupo y están identificados por marcadores genéticos, moleculares e inmunológicos comunes (8). Este parásito además tiene tres estadios morfológicos relevantes: tripomastigote (metacíclico y sanguíneo), epimastigote y amastigote, presentes en las diferentes fases de su ciclo de vida y que se desarrollan en hospederos distintos. Así, en el vector (insecto) se pueden encontrar los estadios morfológicos epimastigote y tripomastigote metacíclico, mientras que en el hospedero mamífero se pueden encontrar los amastigotes y los tripomastigotes sanguíneos (9).

El tratamiento contra el *T. cruzi* está principalmente dirigido al individuo, a fin de curar la infección y disminuir la probabilidad de desarrollar la enfermedad de Chagas, así como también dificultar la cadena de transmisión, al disminuir la oferta parasitaria al medio (10).

No hay vacunas disponibles para la prevención de esta infección y la perspectiva actual sobre el eventual desarrollo de las mismas es incierta (11,12). La quimioterapia específica utilizada en nuestro país y suministrada por el Ministerio de Salud Pública como droga anti-*T. cruzi* es el benznidazol. En general, se acepta que el uso de esta droga es eficaz en la fase aguda de la infección chagásica pero su utilidad en la fase crónica todavía es controvertida. De acuerdo a lo expresado por Sosa-Estani y Segura (11), el tratamiento

es recomendado en "todo paciente que curse la fase aguda, en los niños y adolescentes en la fase indeterminada, en pacientes adultos en fase indeterminada o con una forma cardiaca incipiente asintomática, en accidentes con material contaminado en laboratorio o durante cirugía, y en el donante o receptor de trasplante de órganos". También se ha descrito que la terapia antiparasitaria está indicada como profilaxis de reactivación de la infección en pacientes inmunodeprimidos.

Stoppani (13) establece que las diferencias observadas en la efectividad de los tratamientos se explicarían en parte por la existencia de cepas de *T. cruzi* con distintas susceptibilidades (o resistencia) a los fármacos, lo que constituye un problema biológico de gran interés. Estas respuestas diferentes se deberían a la diferencia molecular entre las distintas cepas del parásito. Entre esas propiedades moleculares se encuentran las dependientes de isoenzimas y de los marcadores genéticos. Precisamente el benznidazol actúa inhibiendo la síntesis de ADN, ARN y proteínas y acelerando la degradación de esas macromoléculas.

Por otro lado el *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*, es un árbol dioico que crece hasta 15 metros en Sudamérica, donde es llamado "tembetary hu", ("temb'é"= hoja, "ita"=piedra, "y"= abreviación de "yvyra"= árbol, "hu"=negro, sa'y`u). Decocciones de raíces de esta planta son utilizadas en la medicina tradicional de Paraguay, como antimalárico y antirreumático (14). Extractos alcaloides de esta planta, entre los cuales se encuentra el canthin-6-ona, mostraron buena actividad como antifúngicos (15), así como también buena actividad tripanocida en las formas promastigotas y tripomastigotas de *Leishmania amazonensis* (16), y en *T. cruzi*, en infecciones experimentales en ratones, con las cepas Y y CL Brener (17,18).

Las diferencias observadas en la efectividad de los tratamientos con benznidazol y el hecho de que su eficacia también podría variar según la región geográfica de procedencia del paciente (19), nos hace suponer que podrían encontrarse en circulación ciertas cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes al medicamento, teniendo como antecedente los datos de efectividad y fracasos de los tratamientos reportados en nuestro país (20,21). Por lo tanto, se desarrolló el presente trabajo que tiene como objetivo determinar la sensibilidad *in vitro* al benznidazol de diferentes cepas de *T. cruzi*, pertenecientes a distintos UDTs y que forman parte de la colección de cepas del Departamento de Medicina Tropical del IICS (UNA), incluyendo tres aislados de Paraguay, así como también al extracto de hojas del *Zanthoxylum chiloperone*, para evaluar su efectividad sobre diferentes cepas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño- Estudio experimental *in vitro*.

El estudio se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Tropical del IICS, entre los meses de marzo y julio del 2010. Se solicitó la autorización correspondiente al Jefe del departamento para la utilización de las cepas pertenecientes a la colección de la citada dependencia. Este trabajo fue aprobado por el comité científico y ético del IICS (código M05/10).

Parásitos- Fueron utilizadas para el ensayo formas epimastigotas de 10 cepas de *T. cruzi* (Tabla 1). La cepa Y fue traída en el año 2009 del Instituto René Rachou de Belo Horizonte (Brasil); las cepas CL Brener, Tulahuen, Cayma 3 y Cayma 14 fueron traídas en el año 2008 del criobanco de la London School of Hygiene and Tropical Medicine (Reino Unido); las cepas Angostura 78 y SM606, fueron traídas en el año 2009 de la Facultad de Medicina, Escuela "Luis Razetti" de la Universidad Central de Venezuela y las cepas de Paraguay, T503, T505 y Bebé Samaniego, fueron aisladas y caracterizadas en el Departamento de Medicina Tropical del IICS-UNA. Estas cepas fueron mantenidas en medio LIT (liver infusión tryptose media) (22), suplementado con 10% de suero fetal bovino a 28°C en estufa. El muestreo fue no probabilístico, con selección de las cepas de *T. cruzi* de cada UDT, según disponibilidad y condiciones adecuadas de mantenimiento.

Tabla 1. Cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas en este estudio. Se incluye el equivalente de acuerdo a las diferentes nomenclaturas.

Cepa	Brisse et al. (23)	Zingales et al. (7)	Hospedero/Vector	Origen
SM606	Tcl	Tcl	<i>Didelphis</i> spp	Venezuela
Angostura 78	Tcl	Tcl	<i>Triatoma maculata</i>	Venezuela
Bebé Samaniego	TclIb	TclII	Humano	Paraguay
Y	TclIb	TclII	Humano	Brasil
Cayma 3	TclIc	TclIII	<i>Euphractus sexcinctus</i>	Bolivia
Cayma 14	TclIc	TclIII	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Bolivia
T503	TclId	TcV	<i>Triatoma infestans</i>	Paraguay
T505	TclId	TcV	<i>Triatoma infestans</i>	Paraguay
CLBrener	TclIe	TcVI	Humano	Brasil
Tulahuen	TclIe	TcVI	Humano	Chile

Droga- Se utilizó benznidazol en comprimido de 100mg, del Laboratorio Farmacéutico del Estado de Pernambuco S/A (LAFEPE), disuelto en solución fisiológica según el método descrito por Neves (24).

Extracto- Se utilizó el extracto etanólico concentrado de hojas de *Zanthoxylum chiloperone*, como se describió anteriormente por Schiplander y Mitscher (25) y Thouvenel et al. (15), posteriormente se diluyó en solución fisiológica. La colecta se llevó a cabo en la zona de Piribebuy, departamento de Cordillera, Paraguay, en mayo del año 2009, y se identificó en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas–Universidad Nacional de Asunción (AF 917).

Determinación de la CL50 del benznidazol- Por medio de un estudio piloto se estableció la concentración de benznidazol a utilizar. Se realizaron diluciones y se probó la sensibilidad a las mismas con la cepa Tulahuen, seleccionada al azar entre las cepas de referencia, en una proporción 1:9 (volumen final 1mL), (Figura 1).

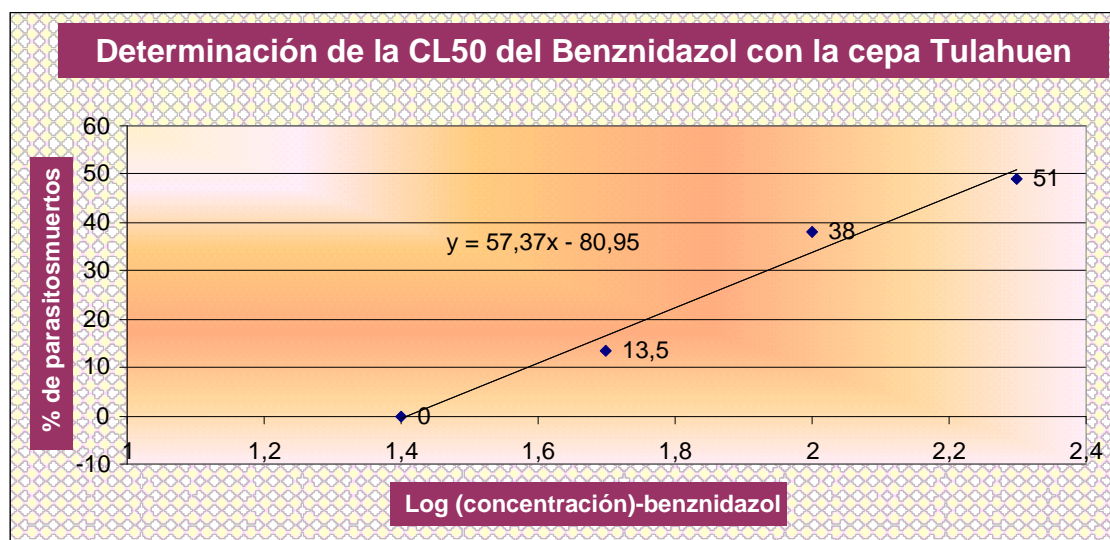


Figura 1. Logaritmo de la concentración del benznidazol vs porcentaje de parásitos muertos (cepa Tulahuen).

Determinación de la CL50 del *Zanthoxylum chiloperone*- Por medio de un estudio piloto se estableció la concentración del extracto de *Zanthoxylum chiloperone* a utilizar. Se realizaron diluciones y se probó la sensibilidad a las mismas con la cepa Tulahuen, seleccionada al azar entre las cepas de referencia en una proporción 1:9 (volumen final 1mL) (Figura 2).

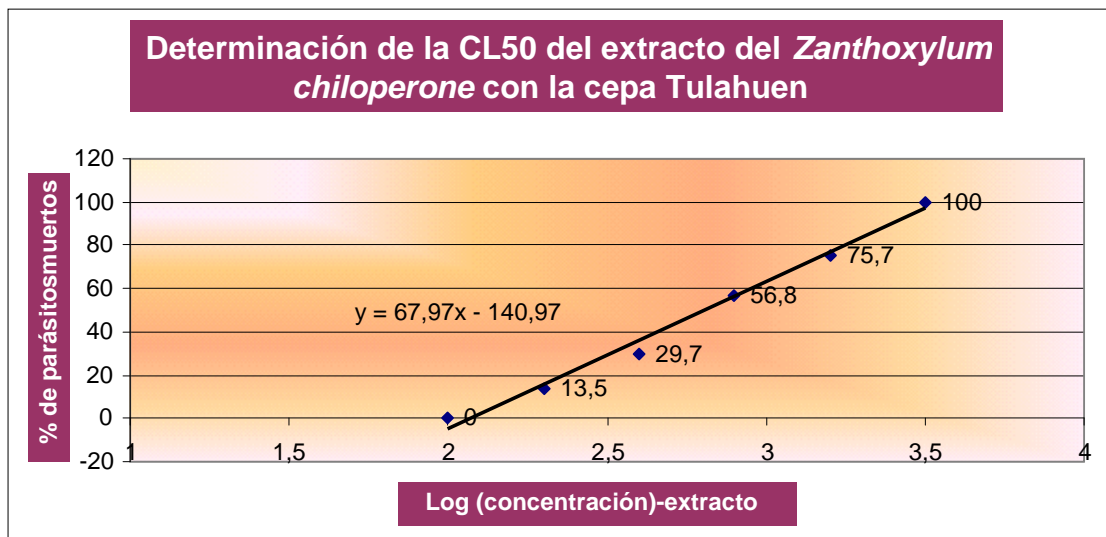


Figura 2. Logaritmo de la concentración del extracto de *Zanthoxylum chiloperone* vs. porcentaje de parásitos muertos (cepa Tulahuen).

Susceptibilidad in vitro al benznidazol y *Zanthoxylum chiloperone*- Se utilizaron las formas epimastigotas de las cepas seleccionadas, con concentraciones entre 1×10^5 y 7×10^5 parásitos/mL, puestas en contacto con el benznidazol y el extracto del *Zanthoxylum chiloperone* en proporción 9:1 respectivamente (volumen final 100 μ L), en microplacas estériles de fondo plano. Las microplacas se incubaron a 28°C y se procedió al recuento de parásitos en cámara de Neubauer a las 24 y 48 horas. El ensayo se realizó por triplicado. Se utilizó solución fisiológica como control negativo y violeta de genciana a 100 μ g/mL como control positivo.

Para la determinación del porcentaje de lisis (muerte), se recurrió a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ lisis} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de parásitos/mL solución fisiológica} - \text{N}^\circ \text{ de parásitos/mL (del cultivo) con el producto}}{\text{N}^\circ \text{ de parásitos/mL solución fisiológica}}$$

El grado de sensibilidad de las cepas fue estimado por el porcentaje de lisis de los parásitos, de acuerdo a la siguiente escala establecida de manera arbitraria:

- 0%, indica nula sensibilidad del parásito a la droga o extracto.
- 1-25%, indica una escasa sensibilidad del parásito a la droga o extracto.
- 26-50%, indica poca sensibilidad del parásito a la droga o extracto.
- 51-75%, indica aceptable sensibilidad del parásito a la droga o extracto.
- 76-100%, indica una alta sensibilidad del parásito a la droga o extracto.

Los datos fueron cargados en una planilla de Excel. Se calcularon la media y el desvío estándar de los porcentajes de lisis obtenidos con cada cepa, para el benznidazol y el extracto vegetal, a las 24 y 48 horas y con ellos se elaboraron tablas y gráficos.

RESULTADOS

Determinación del CL50 del benznidazol

La línea de regresión del logaritmo de las diferentes concentraciones de fármaco contra el recuento de parásitos y el porcentaje de muerte se puede observar en la Figura 1. La CL50 para la cepa Tulahuen resultó ser de 183µg/mL (equivalente a aproximadamente log CONC de 2,35), por lo tanto, la concentración de benznidazol empleada para el estudio fue de 200µg/mL.

Determinación del CL50 del extracto del *Zanthoxylum chiloperone*

La línea de regresión del logaritmo de las diferentes concentraciones contra el recuento de parásitos y el porcentaje de muerte se puede observar en la Figura 2. La CL50 para la cepa Tulahuen resultó ser de 641, 2µg/mL (equivalente a aproximadamente log CONC de 2,8), por lo tanto, para el estudio se utilizaron tres concentraciones del extracto del *Zanthoxylum chiloperone*: 500, 700 y 900µg/mL.

Susceptibilidad *in vitro* al benznidazol

Las diferentes cepas utilizadas en el estudio presentaron un amplio rango de porcentajes de lisis, lo que demuestra que cada una responde de manera distinta a una misma concentración del benznidazol (200 µg/mL).

La cepa con mayor sensibilidad fue Angostura (TcI), con 90,3% a las 24 hs, mientras que la cepa que mostró nula sensibilidad al benznidazol fue Cayma 14 (TcIII), con 0% de lisis a las 48 hs de exposición a la droga. Las cepas Cayma 3 (TcIII) e Y (TcII) presentaron escasa sensibilidad (1-25%); SM606 (TcI) presentó poca sensibilidad (26-50%); Bebé Samaniego (TcII), T503 (TcV), T505 (TcV), CL Brener (TcVI) y Tulahuen (TcVI) presentaron aceptable sensibilidad (51-75%). El recuento de parásitos a las 24 horas no resultó muy diferente al de las 48 horas. El rango de porcentajes de lisis entre las diferentes cepas luego de las 24hs y 48hs de exposición al benznidazol es ilustrado en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de lisis luego de 24 y 48 horas de incubación a 28°C de las cepas de *Trypanosoma cruzi* con el benznidazol (200 µg/mL).

Cepa	% de lisis 24 hs	Desvío estándar	% de lisis 48 hs	Desvío estándar
Angostura 78	90,3	2,4	90,8	2,6
SM606	41,0	5,9	53,8	6,1
Bebé Samaniego	58,0	11,9	59,3	11,8
Y	23,5	8,7	25,0	8,2
Cayma 3	19,8	8,4	22,2	9,5
Cayma 14	0,0	0,0	0,0	0,0
T503	59,2	12,8	60,0	10,1
T505	66,2	4,3	73,1	4,2
CL Brener	71,1	7,0	73,7	5,2
Tulahuen	51,3	9,4	60,0	11,1

Susceptibilidad *in vitro* al extracto de *Zanthoxylum chiloperone*

A la concentración de 900µg/mL del extracto del *Zanthoxylum chiloperone* se observó lisis total de parásitos en todas las cepas. A la concentración de 700µg/mL Angostura 78, SM606, Y, Cayma 3, Cayma 14, T505 y CL Brener presentaron 100% de lisis, mientras que Tulahuen presentó el menor porcentaje de lisis con 57,6% a las 24 y 48 horas. T503 presentó también una alta sensibilidad (93,9%), mientras que la cepa Bebé Samaniego presentó sensibilidad aceptable (70,8%).

A la concentración de 500µg/mL del extracto, sólo Angostura 78, SM606, Cayma 3, y CL Brener permanecieron con 100% de lisis de parásitos. Las cepas Y, Cayma 14 y T505 también presentaron alta sensibilidad (entre 82,1% y 96,3%), mientras que Bebé Samaniego con 2,1% de lisis a las 24 horas fue la cepa de menor sensibilidad. T503 presentó sensibilidad aceptable (72,7%), mientras que Tulahuen presentó poca sensibilidad (27,3%) (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de lisis luego de 24 y 48 horas de incubación a 28°C, de las cepas de *Trypanosoma cruzi* con el extracto del *Zanthoxylum chiloperone*.

Cepa	500µg/mL				700µg/mL			
	% lisis 24hs	Desvío estándar	% lisis 48hs	Desvío estándar	% lisis 24hs	Desvío estándar	% lisis 48hs	Desvío estándar
Angostura 78	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
SM606	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
Bebé Samaniego	2,1	0,0	4,2	0,2	70,8	7,2	70,8	7,2
Y	82,1	13,1	92,3	13,3	100,0	0,0	100,0	0,0
Cayma 3	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
Cayma 14	96,3	6,4	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
T503	72,7	9,1	72,7	0,0	93,9	5,2	93,9	5,2
T505	92,9	7,1	95,2	4,1	100,0	0,0	100,0	0,0
CL Brener	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
Tulahuen	27,3	13,9	42,4	12,0	57,6	5,2	57,6	5,2

Organizando los datos obtenidos en base al porcentaje de lisis a las 24 hs de exposición al benznidazol y al extracto de *Zanthoxylum chiloperone*, se obtuvo la Figura 3, en la cual se observa la cantidad de cepas que presentan nula sensibilidad (0%), escasa sensibilidad (1-25%), poca sensibilidad (26-50%), aceptable sensibilidad (51-75%) y alta sensibilidad (76-100%).

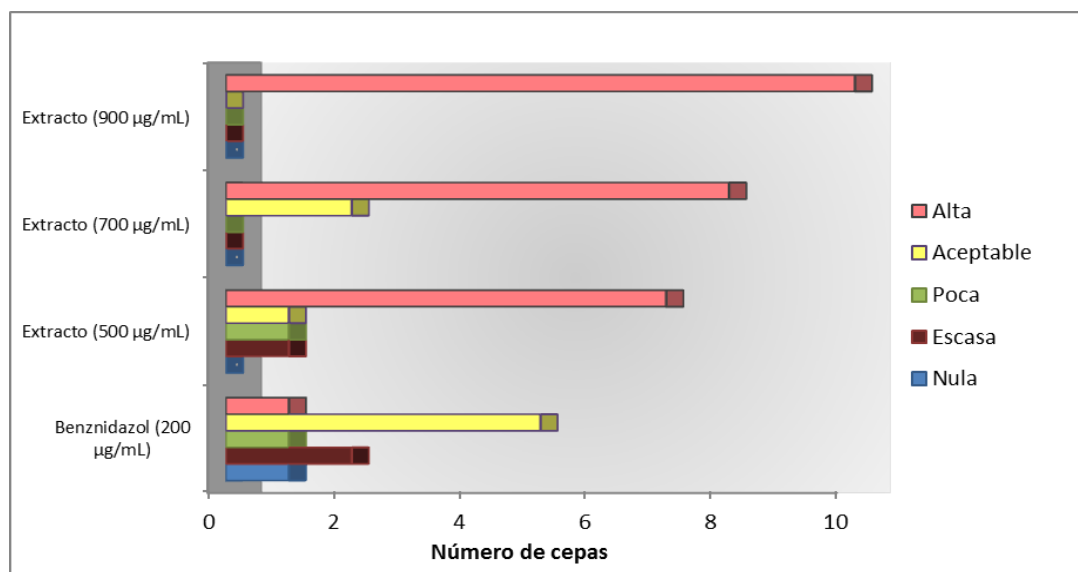


Figura 3. Número de cepas incluidas en diferentes rangos de sensibilidad al benznidazol y al extracto vegetal (24 horas).

DISCUSIÓN

Un aspecto a tener en cuenta en el tratamiento de la enfermedad de Chagas se refiere a las variaciones intrínsecas de su agente causal, ya que podría influir en el éxito o fracaso del mismo. Diferencias en la sensibilidad al benznidazol *in vitro* de diferentes cepas de *T. cruzi* han sido descritas por varios grupos de investigadores, entre ellos Grosso et al. (26), quienes describen estas diferencias en cepas aisladas en Nicaragua, Luna et al. (27) y Mejía-Jaramillo et al. (28) en cepas colombianas y de referencia, Martínez-Díaz et al. (29) en cepas brasileras y bolivianas, Muñoz-Calderón et al. (30) en cepas de Venezuela y Revollo et al. (31) en veintiún cepas de distintos orígenes. Así mismo, Veloso et al. (32) estudiaron cepas colombianas y de referencia en ensayos *in vivo*, demostrando también diferencias de sensibilidad entre las distintas cepas ante la exposición al benznidazol, así como Filardi y Brener (33) con cuarenta y siete cepas aisladas en Brasil. En el presente estudio por primera vez se incluyen cepas aisladas en Paraguay, de las cuales no se tienen datos sobre la susceptibilidad *in vitro* a esta droga utilizada en el tratamiento. En todas las cepas estudiadas se observó sensibilidad al benznidazol, excepto en Cayma 14 proveniente de un armadillo selvático de Bolivia, y que a la concentración empleada (200 µg/mL), no presentó muerte de parásitos. Sería importante hacer un estudio de sensibilidad de esta cepa a mayores concentraciones del fármaco y a mayor tiempo de exposición para corroborar si estamos ante una cepa resistente. Esta cepa sin embargo presentó alta sensibilidad a todas las concentraciones estudiadas del extracto de *Zanthoxylum chiloperone*. De hecho, el extracto de hojas de esta planta se ha propuesto como un medicamento alternativo y sustentable para la enfermedad de Chagas (18) y quizás también pueda ser utilizado en casos de cepas que han mostrado cierto grado de resistencia a las drogas convencionales, aunque más estudios en esta área son necesarios.

Así como Cayma 14 del grupo TcIII no presentó sensibilidad al benznidazol, la cepa Cayma 3, perteneciente al mismo grupo presentó una baja sensibilidad (19,8% a las 24hs) y alta sensibilidad al extracto de *Zanthoxylum chiloperone* en todas las concentraciones estudiadas. Cabe destacar el porcentaje de sensibilidad al benznidazol de la cepa Y (23,5%), dado que es una cepa de referencia así como de Tulahuen (51,3%) y CL Brener (71,1%). Estos resultados coinciden con un trabajo previo realizado por Filardi y Brener (33) quienes en ensayos *in vivo* observaron que las cepas CL Brener e Y fueron susceptibles y medianamente resistentes respectivamente al benznidazol y nifurtimox. Las mismas también respondieron de manera muy diferente al extracto de *Zanthoxylum chiloperone*; siendo Tulahuen la de menor sensibilidad (27,3% a 500 µg/mL y 57,6% a 700 µg/mL), Y con 82,1% a 500 µg/mL y 100% a 700 µg/mL y CL Brener con alta sensibilidad a las concentraciones estudiadas. Estas tres cepas presentaron porcentajes de lisis muy diferentes, por lo tanto se debería tener en cuenta estas variaciones en los estudios de sensibilidad a quimioterapéuticos, fomentando la utilización de varias cepas en los tamizajes primarios de nuevos antichagásicos.

Si bien las cepas del grupo TcIII, V y VI presentaron sensibilidad escasa, aceptable y aceptable respectivamente al benznidazol, no se puede concluir que esta sensibilidad dependa del grupo o la clasificación en que se encuentran, ya que los resultados fueron bastante dispares para los miembros de cada grupo, en especial para las del grupo TcI y TcII (Tabla 2), aunque los resultados fueron similares con el extracto vegetal. Hasta la fecha no se ha observado una correlación directa entre la resistencia a drogas y los diferentes UDTs del *T. cruzi* y parece ser más bien una característica inherente a cada cepa individualmente (34). Por lo tanto, cepas pertenecientes al mismo UDT pueden mostrar diferentes rangos de susceptibilidad a los fármacos.

Cinco cepas presentaron sensibilidad aceptable al benznidazol (51-75%) a la concentración utilizada, grupo en el cual están incluidas las aisladas en Paraguay, de triatomíneos domésticos y de un paciente. En cuanto al extracto de *Zanthoxylum chiloperone* siete, ocho y diez cepas presentaron alta sensibilidad a 500 µg/mL, 700 µg/mL

y 900µg/mL respectivamente. La cepa Bebé Samaniego a 500µg/mL de extracto fue la única cepa con baja sensibilidad (2,1%), mejorando a 700µg/ml a aceptable con 70,8%; las otras cepas paraguayas (T503 y T505) presentaron sensibilidades aceptable y alta respectivamente a 500µg/mL y ambas altas a 700µg/mL.

La variabilidad observada en la susceptibilidad al benznidazol entre las cepas incluidas en el presente estudio, refuerza la importancia del seguimiento del paciente en tratamiento, para la determinación y evaluación de las concentraciones efectivas del benznidazol u otro fármaco utilizado, ya que de ello depende la regresión de la infección y un mejor pronóstico de la enfermedad. Especialmente cuando se ha descrito en la literatura que la resistencia a los medicamentos puede ser también inducida por diferentes presiones de la droga sobre el parásito y que la administración de dosis inadecuadas y discontinuas, pueden favorecer la aparición de cepas resistentes (35,36). Así mismo, este estudio se constituye en el primer trabajo que incluye a cepas aisladas en Paraguay, de las cuales previamente no se tenía información sobre la sensibilidad *in vitro* a drogas antichagásicas, aunque se necesita incluir un mayor número de cepas en futuros trabajos, incorporando aislados pertenecientes al ciclo doméstico y al selvático.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, Gonzalez N, Percoco G, Borges R, Guevara P, Ramirez JL. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60:726-32.
2. World Health Organization. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO/HTM/NTD. 2010.
3. Llewellyn MS, Lewis MD, Acosta N, Yeo M, Carrasco HJ, Segovia M, et al. *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3:e510.
4. Schofield C, Jannin J, Salvatella R. The Future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 2006; 22:583-8.
5. López-Antuñano FJ. Quimioterapia de la infecciones producidas por *Trypanosoma cruzi*. *Salud Pública de Méx.* 1997; 39:463-71.
6. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104:1051-4.
7. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012; 12:240-53.
8. Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol.* 1998; 28:85-104.
9. Guzmán E, Zabala J, Acosta K, Rosado M. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Biomed.* 1999; 10:177-84.
10. Sosa-Estani E, Segura E. Tratamiento de la infección por *Trypanosoma cruzi* en fase indeterminada. Experiencia y normalización en la Argentina. *Medicina, Buenos Aires.* 1999; 57:13-4.
11. Tarleton R. Chagas disease: a role for autoimmunity?. *Trends Parasitol.* 2003; 19:447-51.
12. Beaumier CM, Gillespie PM, Hotez PJ, Bottazzi ME. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. *Transl Res.* 2013; 162:144-55.
13. Stoppani A. Quimioterapia de la Enfermedad de Chagas. *Medicina, Buenos Aires.* 1999; 59:147-65.
14. Milliken W. Plants for Malaria, Plants for Fever: Medicinal Species in Latin America—a Bibliographic Survey. Kew Publishing. 1997; p.122.
15. Thouvenel C, Gantier J, Duret, P, Fourneau C, Hocquemiller R, Ferreira M, et al. Antifungal compounds from *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. *Phytotherapy Research.* 2003; 17:678–80.
16. Ferreira ME, Rojas de Arias A, Torres de Ortiz S, Inchausti A, Nakayama H, Thouvenel C, et al. Leishmanicidal activity of canthin-6-one alkaloids isolated from *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. *J Ethnopharmacol.* 2002; 80:199–202.

17. Ferreira ME, Nakayama H, de Arias AR, Schinini A, de Bilbao NV, Serna E, et al. Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Ethnopharmacol.* 2006; 109:258-63.
18. Ferreira ME, Cebrián-Torrejón G, Corrales AS, Vera de Bilbao N, Rolón M, Gomez CV, et al. *Zanthoxylum chiloperone* leaves extract: first sustainable Chagas disease treatment. *J Ethnopharmacol.* 2011; 133:986-93.
19. Urbina J. Parasitological Cure of Chagas Disease: Is it Possible?, Is it Relevant?. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94:349-55.
20. Vera de Bilbao N, Samudio M, Schinini A, Acosta N, López E, González N, et al. Evaluación a 24 meses post-tratamiento con Benznidazol en niños de 6 a 12 años infectados con *Trypanosoma cruzi*. *Rev Patol Trop.* 2004; 33:301-312.
21. Vera de Bilbao N, Elías E, Martínez J, Carpinelli de Tomassone M, Torres S, Sosa L, Díaz V. Evolución serológica y parasitológica post-tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas crónica reciente. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2006; 2:5-10.
22. Camargo E. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origen of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1964; 6:93-100.
23. Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 2001; 31:1218-26.
24. Neves A, Soares J, da Silva J, Cavadinha R, Marques A, Rolim P. Development of dissolution method for benznidazole tablets. *Quim Nova.* 2009; 32:2196-9.
25. Schiplander MT, Mitscher LA. A facile one-step synthesis of benz [4,5] canthin-6-one. *J Hetero Chemis.* 1971; 8:695-96.
26. Grosso NL, Bua J, Perrone AE, Gonzalez MN, Bustos PL, Postan M, et al. *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of a isolate from an endemic area and its susceptibility to conventional drugs. *Exp parasitol.* 2010; 126:239-44.
27. Luna K, Hernández I, Rueda C, Zorro M, Croft S, Escobar P. *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. *Biomédica.* 2009; 29:448-55.
28. Mejía-Jaramillo AM, Fernández GJ, Montilla M, Nicholls RS, Triana-Chávez O. *Trypanosoma cruzi* strains resistant to benznidazole occurring in Colombia. *Biomédica.* 2012; 32:196-205.
29. Martínez-Díaz RA, Escario JA, Nogal-Ruiz JJ, Gómez-Barrio A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96:53-9.
30. Muñoz-Calderón A, Santaniello A, Pereira A, Yannuzzi J, Díaz-Bello Z, Alarcón de Noya B. Susceptibilidad *in vitro* a Nifurtimox y Benznidazol de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de pacientes venezolanos con enfermedad de Chagas infectados por mecanismos de transmisión oral y vectorial. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol.* 2012; 71:14-22.
31. Revollo S, Oury B, Laurent JP, Barnabe C, Quesney V, Carriere V. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp Parasitol.* 1998; 89:30-9.
32. Veloso V, Carneiro C, Toledo M, Lana M, Chiari E, Tafuri W, et al. Variation in Susceptibility to Benznidazole in Isolates Derived from *Trypanosoma cruzi* Parental Strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz Vol.* 2001; 96:1005-11.
33. Filardi L, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987; 81:755-9.
34. Villarreal D, Barnabé C, Sereno D, Tibayrenc M. Lack of correlation between *in vitro* susceptibility to Benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Exp Parasitol.* 2004; 108:24-31.
35. Dos Santos FM, Caldas S, de AssisCáu SB, Crepalde GP, de Lana M, Machado-Coelho GL, et al. *Trypanosoma cruzi*: Induction of benznidazole resistance *in vivo* and its modulation by *in vitro* culturing and mice infection. *Exp Parasitol.* 2008; 120:385-90.
36. Mejía AM, Hall BS, Taylor MC, Gómez-Palacio A, Wilkinson SR, Triana-Chávez O, et al. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *J Infect Dis.* 2012; 206:220-8.