

EFFECTO SUPRESIVO DEL "AMBILHAR" (1-(5-NITRO-2-TIAZOLIL)-2-IMIDAZOLIDINONA) SOBRE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL DEL RATÓN POR *SCHIZOTRYPANUM CRUZI*. I — CONSIDERACIONES INICIALES

Alberto VELÁSQUEZ-ANTICH (1)

RESUMEN

El "Ambilhar" se presenta como un medicamento dotado de potente actividad anti-chagásica experimental. Esto unido al conocimiento de su dosis terapéutica y su toxicidad en el hombre, indican su inmediata evaluación, con el objeto de averiguar su potencial anti-chagásico en el humano.

Resulta interesante que el "Ambilhar" sea activo en las bilharziosis, en la amibiasis intestinal y hepática humanas y en la tripanosomiasis cruzi experimental del ratón, porque puede indicar la existencia de vías metabólicas comunes entre esos parásitos, lo cual abre el camino a investigar drogas más potentes, multi-activas, que ataquen varias enfermedades parasitarias al mismo tiempo.

INTRODUCCIÓN

En vista del potencial antiparasitario múltiple que ha mostrado el "Ambilhar", ya que además de su actividad anti-bilharziana (1, 10, 11, 12, 13, 14) se le ha señalado actividad anti-amibiana potente (7, 17) y actividad anti-leishmánica discutible (19) y por la similitud química existente entre los nitroheterociclos: nitrofuranos y nitro-imidazoles, con el "Ambilhar" (nitrotiazol), creimos de interés comprobar si este último, como los dos primeros mencionados, poseía también acción contra el *Schizotrypanum cruzi* (3, 4, 5, 6, 15, 16, 22) (Véanse fórmulas). En este estudio comprobamos que el "Ambilhar", efectivamente, posee un marcado efecto anti-chagásico experimental en gran escala, pues preliminarmente el Autor ya lo había mostrado (21) en una breve casuística experimental.

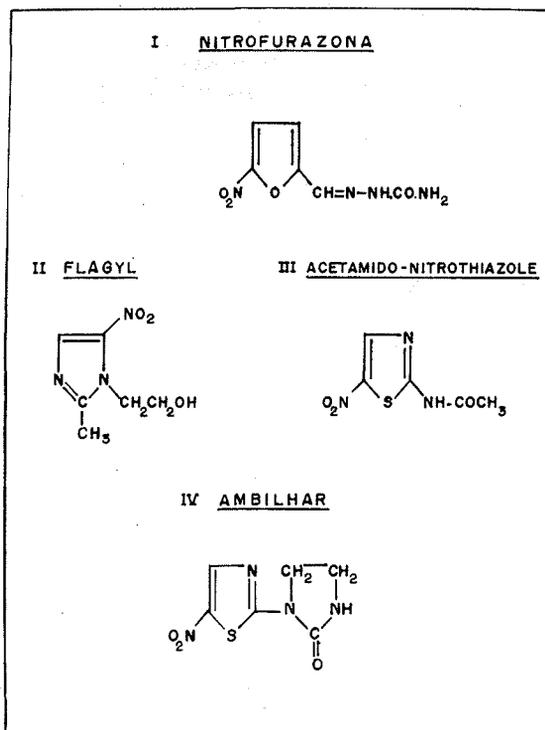
MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa de *Trypanosoma cruzi* empleada es la "Y" (20) que viene siendo mantenida por

nosotros hace casi tres años (143 pasajes), en ratones albinos, machos, de la raza I.M.T. (Instituto de Medicina Tropical), semanalmente, por inoculaciones de sangre, de ratón a ratón.

La inoculación parasitaria es de carácter cuantitativa y se realiza por el método de PIZZI modificado por BRENER (2): se toman 5 mm³ de sangre de la cola del ratón infectado y se colocan entre lámina y laminilla (22 x 22 mm). Se examinan 100, 50 ó 25 campos, de acuerdo con el número menor o mayor de tripanosomas presentes, con 500 aumentos, y el total de parásitos obtenidos del conteo se multiplica por un factor variable de 63, 126 ó 252, según el número de campos microscópicos examinados, respectivamente. Esta cifra obtenida representa el número aproximado de tripanosomas presentes en 5 mm³ de sangre pura. Se sangra el ratón escogido, por vía axilar, y se recoge esta sangre en citrato de sodio al 3,8%. Como la cantidad de citrato es conocida, el total obtenido de sangre-citrato nos permite calcular el número de tripanoso-

(1) Médico de Salud Pública, Ministerio de Sanidad y Asistencia Social; Jefe de la Sección de Quimioterapia, Instituto de Medicina Tropical, Apto. 8250, Ciudad Universitaria, Caracas, Venezuela



Fórmulas de los nitroheterociclos "Nitrofurazona", "Flagyl" y "Ambilhar"

mas en 0,1 cc. de esa dilución; e inocular de acuerdo con los requerimientos. La inoculación se realiza por vía intraperitoneal.

El medicamento empleado en estas investigaciones es el "Ambilhar" en tabletas de 500 mg, que se pulverizan completamente en un mortero de porcelana. Pesando previamente la tableta puede calcularse la cantidad de droga pura contenida en una determinada cantidad de polvo total, de donde puede calcularse la cantidad a pesar, de acuerdo con la dosis escogida. El polvo se disuelve en agua destilada y se le adiciona goma arábica para obtener una mejor suspensión. Se administra por vía oral, mediante una aguja terminada en bola que alcanza el estómago y protege de traumatismos mayores el trayecto a recorrer.

Los criterios empleados para la evaluación de "curación" o SUPRESION DEFINITIVA de la infección son: sub-inoculación, re-inoculación, xenodiagnóstico, exámenes de sangre fresca después de suspendido el tratamiento, obser-

vación de la sobrevida y estudio anatómo-patológico de cortes de órganos en busca de nidos de leishmania.

EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

Comprobación de Actividad Supresiva en Gran Escala

Se inoculó un lote de setenta ratones con 68.040 formas sanguícolas de *S. cruzi* y se dividió en dos grupos: veinte testigos sin tratamiento y cincuenta tratados, a razón de 140 mg/kg (aproximadamente 1/10 de LD50 Oral Aguda = 1400 ± 240 mg/kg) vía oral, durante veintidós días consecutivos. La actividad supresiva del medicamento es evidente a partir del quinto día posterior a la inoculación (primer examen) y se mantiene salvo en el 9,5% (4/42), en los que aparecen parásitos circulantes durante el curso del tratamiento. La continuación del tratamiento, sin embargo, provoca supresión en estos ratones positivos (Fig. 1). En comparación, los testigos sin tratamiento presentan tripanosomas circulantes al 5.º día, al 8.º día, y posteriormente, en cualquier momento que se examinen, hasta la muerte (Cuadro I).

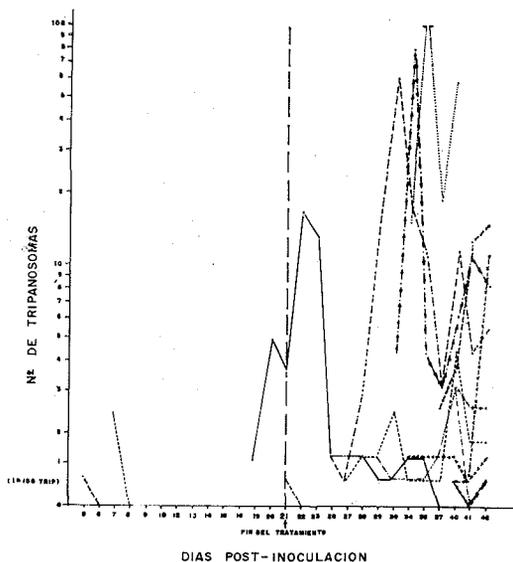


Fig. 1 — Evolución de la parasitemia en los ratones positivos, durante y después del tratamiento con "Ambilhar" (140 mg/kg/día X 21 días). (Número de tripanosomas en 5 mm³)

CUADRO I

Testigos sin tratamiento. Número de tripanosomas en 5 mm³ de sangre caudal. Inoculación: 68.040 tripanosomas

Ratón N.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Promedios
Días post-inoc.																					
5.º	0	63	567	126	378	126	1134	63	63	693	126	252	378	189	63	441	126	3465	441	189	444
8.º	1008	756	756	567	5040	6048	441	315	504	504	630	882	567	315	441	1008	189	12884	3843	1575	1912

La sangre caudal de los animales tratados examinada hasta veintiún días después de suspender el tratamiento, es negativa en el 71,1% (27/38) de los sobrevivientes y positiva en el 28,9% (11/38), (Fig. 2). El número de exámenes realizados en esos 21 días fué de trece.

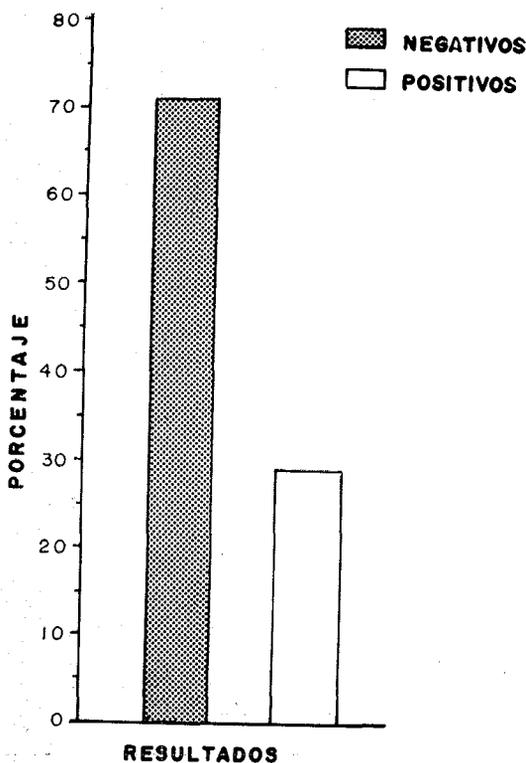


Fig. 2 — Resultados de la investigación de tripanosomas en los sobrevivientes a la terapéutica con "Ambilhar" (140 mg/kg/día X 21 días) 21 días después de la suspensión del tratamiento

El porcentaje de mortalidad durante el tratamiento fué de 16% (8/50). Es de notar que todos murieron con exámenes negativos de sangre periférica. El porcentaje de mortalidad cuarenta y dos días después de inoculación, o sea, para el momento de proceder a realizar la mezcla al azar de ratones negativos a tripanosomas, para la realización de exámenes subsecuentes, fué de 24% (12/50).

El grupo de 27 sobrevivientes negativos (54% del total inoculado = 27/50) se mezcla entre sí, al azar (estaban colocados en cinco jaulas de a 10 ratones c/u) y se subdividen en cuatro grupos, para practicar: sub-inoculación y estudio anatómo-patológico (6 animales), re-inoculación (5), xenodiagnóstico (7), continuos exámenes de sangre periférica y observación de sobrevida (9 animales).

Resultados de la sub-inoculación — cada uno de los seis animales de este grupo, negativos — a tripanosomas al vigésimo-primer día después de la suspensión del tratamiento, se sangra por vía axilar y se inocula en dos ratones albinos, jóvenes, machos, de 14 a 16 gramos, muy sensibles a la infección de la raza I.M.T., a razón de 0,4 cc de sangre citratada, por vía I.P. Se inyectaron pues doce ratones en estas condiciones y se les examinó sangre periférica durante más de seis semanas, comenzando al 5.º día después de la inyección, una o dos veces al día, alternadamente para investigar la presencia de infección. Fueron hechos 45 exámenes de sangre por ratón, o quinientos quince (515) exámenes en el grupo completo, en el curso de cuarenta y nueve días. El resultado de la sub-inoculación fué NEGATIVO.

Resultados de la re-inoculación — un grupo de cinco ratones fué re-inoculado 26 días des-

pués de suspendido el tratamiento, a razón de, aproximadamente, 4.000 tripanosomas sanguícolas por gramo-ratón, I.P. Se inocularon 4 testigos de peso similar, aun cuando inevitablemente más jóvenes, de la misma manera.

Se observó la aparición de una típica fase aguda, en todos y cada uno de los re-inoculados, con parasitemias siempre superiores a 5.000 tripanosomas en 5mm^3 de sangre caudal, con un promedio de 10.597 al 8.º día.

Los testigos se comportaron de manera similar, como era de esperar, pero con parasitemias más elevadas en el mismo 8.º día, con un promedio de 21.287 tripanosomas (Fig. 3).

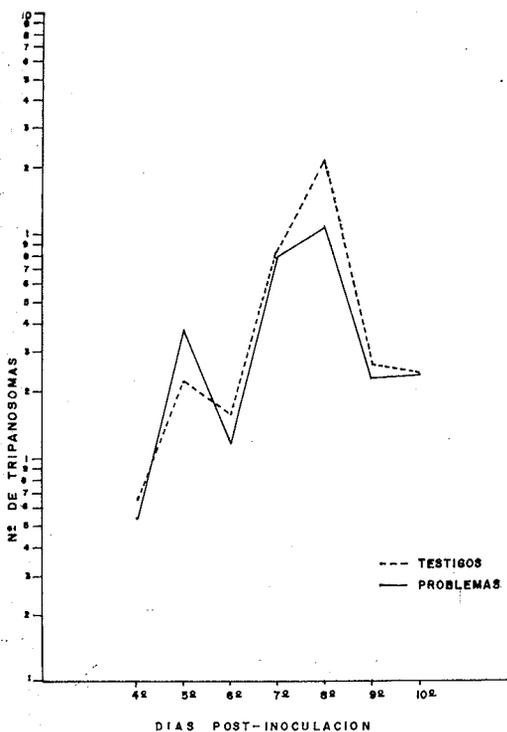


Fig. 3 — Curva de promedios del número de tripanosomas en 5mm^3 de sangre caudal de ratones testigos y tratados sometidos a la prueba de la re-inoculación. Inoculación: 4.000 tripanosomas/g. ratón

Resultados del xenodiagnóstico — se practicó el xenodiagnóstico en siete ratones, veintiseis días después de la suspensión del tratamiento.

Se anestesiaron con Somifene oral, a razón de 0,01 a 0,02 cc por 20 gramos-ratón. Se utilizaron ninfas de tercero a quinto estadio de *Triatoma maculata*, distribuidas a cinco por caja, por ratón, (total 35 ejemplares) y se aplicaron al abdomen afeitado de cada uno de los ratones anestesiados, cubriéndose con un trapo negro. Se dejaron alimentar durante una hora y quince minutos, al cabo de la cual lo habían hecho, aparentemente, 17 insectos. Murieron dos ratones a consecuencia de esta alimentación. Una segunda comida se permitió a los triatominos, en los mismos ratones objeto de la experiencia, quince días después de la primera, alimentándose en ratones sanos los insectos de dos cajas, por muerte de los donantes durante la primera comida. Los ratones restantes murieron después de esta comida.

El examen del xenodiagnóstico, practicado entre treinta y cinco y cincuenta días después de la primera comida fué NEGATIVO. (Sólo fueron examinados 28 triatomas porque murieron siete).

Resultados de los exámenes de sangre fresca post-tratamiento. Observación de la sobrevivencia — nueve animales continuaron siendo examinados desde el vigésimo primer día después de la inoculación, hasta por três meses más (92 días exactamente), habiendo sido examinados hasta 113 días después de la inoculación, con excepción de sábados y domingos. El resultado fué NEGATIVO.

La mortalidad ha alcanzado, después de 113 días de la inoculación, o 92 días después de la suspensión del tratamiento, a tres de los nueve ratones, a los 54, 69 y 87 días después de la inoculación. Estos han muerto sin presentar parásitos en sangre periférica.

Continuará la observación de este grupo indefinidamente.

Resultados del estudio anatómico-patológico — corazón, hígado, bazo, músculo esquelético y médula ósea de los seis animales sacrificados para sub-inoculación fueron sometidos a corte y coloración por la hematoxilina-eosina. Se examinaron en promedio 75 cortes por animal o 500 cortes en el grupo, con resultados negativos a formas parasitarias de *S. cruzi*.

VELAZQUEZ-ANTICH, A. — Efecto supresivo del "Ambilhar" (1-(5-nitro-2-tiazolil)-2-imidazolidinona) sobre la infección experimental del ratón por *Schizotrypanum cruzi*. I — Consideraciones iniciales. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12:347-353, 1970.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Como se desprende de las experiencias anteriormente descritas hay una clara evidencia de que el "Ambilhar" provoca SUPRESION DEFINITIVA, o "curación", en aproximadamente el 54% del total de ratones inoculados o el 70% de los sobrevivientes, después de un curso terapéutico de 21 días a 140 mg/kg, vía oral, administrado desde el día siguiente a la inoculación parasitaria.

Los resultados de la experiencia son confirmados ampliamente con los de la *sub-inoculación negativa*, la *re-inoculación positiva*, el *xenodiagnóstico negativo* y la *ausencia de formas leishmania* de *S. cruzi* en los cortes *histológicos* estudiados.

La aparición de típicas fases agudas en los ratones sujetos a la prueba de re-inoculación indica que estos no eran resistentes a la infección, o lo que es lo mismo, que no estaban infectados al momento de realizar dicha prueba. Se sabe experimentalmente que existe una marcada resistencia a las superinfecciones en la enfermedad de Chagas, que impide que nuevas inoculaciones de tripanosomas provoquen circulación abundante de parásitos en sangre periférica. Además, en ningún momento este tipo de animales es susceptible de desarrollar una típica fase aguda. El hecho de que los testigos de la re-inoculación presentaran al 8.º día una parasitemia promedio superior a los ratones problema es explicable por el hecho de ser aquellos más jóvenes, a pesar de tener un peso similar, casi exacto.

Los resultados del examen microscópico de cortes coloreados de órganos son de menor importancia que los criterios de sub-inoculación, reinoculación, exámenes de sangre negativos post-tratamiento, ya que para el momento de realizar los cortes, los ratones tenían 42 días de inoculados y para esa altura, aun en ratones no tratados, en fase crónica o latente, es muy difícil demostrar la presencia de nidos de leishmania. Sin embargo el hecho de que los cortes de corazón, hígado, bazo, músculo esquelético y médula ósea no estuvieran positivos a leishmanias, indicando los criterios más importantes SUPRESION DEFINI-

TIVA, afirma más las aseveraciones sobre curación de estos animales por acción del "Ambilhar".

Queremos citar aquí las palabras de PRATA que aparecen recogidas en un Simposio sobre "Ambilhar"-bilharziosis⁽¹⁸⁾ y que textualmente dicen así: "We treated patients with acute Chagas' disease with this drug and it had no effects on the circulating trypanosomes; there was no severe reaction in these cases". La respuesta vino a la pregunta de Sadun de que si la droga mostraba "cardiotoxicidad", a él le interesaba saber si alguien la había utilizado en chagásicos, a manera de ver si aumentaba la lesión electrocardiográfica ya presente en ese tipo de pacientes. Prata responde que no ha encontrado reacciones severas en los casos tratados. A propósito de estas palabras nos parece oportuno cuidadosamente la actividad de esta droga, indicar nuevamente la necesidad de evaluar en chagásicos agudos y crónicos, pues el Autor antes nombrado (Prata), no refiere detalles de su tratamiento, tales como número de pacientes, dosis, duración, etc. Debeamos puntualizar que estas palabras son las únicas que hemos encontrado en la literatura en relación a "Ambilhar"-Chagas y no conocemos trabajos experimentales animales o humanos que hagan referencia al efecto anti-chagásico del "Ambilhar". Por lo demás experiencias que hemos realizado y que estarán pronto listas para su publicación indican la posibilidad de la creación de cepas resistentes al "Ambilhar". Por otra parte, es perfectamente posible que la actividad del "Ambilhar" sea evidente en el roedor mientras que en el humano no lo sea; las diferencias metabólicas entre ambas especies son abismales.

Consideramos, de cualquier forma, del mayor interés experimental, la demostración de la actividad del "Ambilhar" contra el *Schizotrypanum cruzi*, puesto que abre caminos de investigación amplios, si se recuerda que es un medicamento dotado de poder terapéutico antibilharziano y antiamibiano. ¿Existirán correlaciones metabólicas entre estos parásitos, o será una simple casualidad la acción

curativa del "Ambilhar" en bilharziosis, en amibiasis humana y en Chagas experimental?

El nitrotiazol ("Ambilhar"), un nitroheterociclo como la Nitrofurazona y el nitroimidazol (Flagyl) tiene base química para esperar una acción anti-chagásica, pues tanto la Nitrofurazona como el Flagyl la poseen.

La evidencia experimental aquí presentada de la actividad del "Ambilhar" contra el *Schizotrypanum cruzi*, unida al amplio conocimiento de la dosis y de la toxicidad en el humano, hacen recomendable su empleo en chagásicos agudos y crónicos y abre la puerta a la investigación de derivados del mismo que puedan ser más activos y aún menos tóxicos.

Nos parece difícil creer que una enfermedad de Chagas humana aguda o crónica cure en 21 días de tratamiento con este medicamento. El "Ambilhar", que se sepa, solo se ha administrado al hombre por períodos de 15 días. Es además evidente como resultó ser en bilharziosis, que la dosis humana fué superior a la teóricamente extrapolable de los animales experimentales⁽⁸⁾. En esas experiencias 100 mg/kg eran una cantidad suficiente experimentalmente, mientras que en el hombre dosis menores de 15 mg/kg no han sido reportadas efectivas. De aquí deducimos que la dosis para chagásicos ha de ser superior a un décimo de la dosis anti-chagásica animal (140 mg/kg). Sería pues recomendable una dosis no menor de 15 a 20 mg/kg, durante todo el tiempo que se pudiera administrar, o por lo menos durante un mes, con las debidas precauciones a juicio clínico.

Por último consideramos que el estudio del mecanismo de acción, en marcha actualmente, podrá ayudar a dilucidar interrogantes tales como: cuál es la fracción del "Ambilhar", la inalterada o sus metabolitos⁽⁹⁾ la que es responsable de la acción?. ¿Son ambas?. ¿Contra qué fase del ciclo parasitario actúa o actúan estas sustancias, contra el tripanosoma circulante, contra la leishmania tisular? ¿Contra ambos?.

Adelantamos la posibilidad de que el medicamento pueda tener acción contra la fase leishmania, sin negar una acción directa sobre el tripanosoma o una acción combinada. Creemos en lo primero porque el corto período

de tratamiento necesario para provocar SUPRESION DEFINITIVA así lo indica. La Nitrofurazona, el más potente anti-chagásico conocido, no cura administrada por sólo 20 días, a pesar de tener una acción anti-leishmánica comprobada en múltiples formas por BRENER⁴,⁶, porque la antedicha droga no ataca ciertos islotes leishmánicos anárquicos, huidizos, siendo estos los que provocan falla terapéutica, como es probable lo sea en "Ambilhar".

SUMMARY

Suppressive effect of "Ambilhar" (1-(5-nitro-2-thiazolyl)-2-imidazolidinone) against experimental S. cruzi infection in mice.

I — Preliminary report

Ambilhar, a nitrothiazol derivative shows a potent suppressive effect against experimental acute mice Chagas' disease. This observation and the fact that its therapeutic dose and toxicity in man are well known calls for its immediate evaluation in human Chagas' disease.

It is interesting to note that Ambilhar is active against human schistosomiasis and amoebiasis, and against experimental *S. cruzi* infection in mice. This knowledge could point towards the existence of common metabolic pathways among these parasites, which opens the possibility to search more potent drugs, multi-active, with a wide potential of action against many parasitary infections at the same time.

AGRADECIMIENTOS

Al personal auxiliar de la Sección de Quimioterapia del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela.

A la Sra. E. de Ramirez de la Sección de Dibujo por el trazado de las ilustraciones.

Agradecimiento especial a los Laboratorios Ciba de Venezuela por su inestimable colaboración. A los Laboratorios Roche de Venezuela por la amable donación del Somifene.

A todos aquellos que de una u otra manera han contribuido a la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. ARFAA, F.; BIJAN, H. & SADEGHI, A. — Mass chemotherapy of urinary bilharziasis with a nitrothiazolyl compound (Ambilhar). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61:653-658, 1967.
2. BRENER, Z. — *Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas*. Tese. Belo Horizonte, Instituto Nacional de Endemias Rurais, 1961.
3. BRENER, Z. — Atividade terapêutica do 5-nitro-2-furaldehído-semicarbazona (Nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 3:43-49, 1961a.
4. BRENER, Z. — Chemotherapeutic studies in tissue cultures infected with *Trypanosoma cruzi*. The mode of action of some active compounds. *Ann. Trop. Med. & Parasit.* 60: 445-451, 1966.
5. BRENER, Z. — Antiprotozoan and antibacterial activity of 2-nitroimidazole derivatives. *Proc. 7th. Intersc. Conf. Antimicrob. Agents & Chemother.* 513-519, 1967.
6. BRENER, Z. & ANDRADE, Z. A. — Ação da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldehído-semicarbazona) sobre as formas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:222-228, 1969.
7. BRUMPT, L. & ARDOIN, F. — Traitement de l'amibiase expérimentale du rat blanc par le niridazole. *Bull. Soc. Path. Exot.* 61:25-30, 1968.
8. CIBA, DOCUMENTATION ON AMBILHAR — Basle, September 1965.
9. FAIGLE, J. W. & KEBERLE, H. — The metabolic fate of Ciba 32,644-Ba. *Acta Tropica* (Suppl.) 9:8-22, 1965.
10. GENTILINI, M.; CAPRON, A.; LE PARCO, J. C.; VERNES, A.; BIQUET, J. & DOMART, A. — Résultats cliniques et séro-immunologiques des essais thérapeutiques par le Ciba 32,644 Ba, portant sur 350 bilharziens chroniques a *Schistosoma haematobium* et *Schistosoma mansoni*. *Bull. Soc. Path. Exot.* 60: 241-263, 1967.
11. HASEEB, M. A.; FADL, A. & HUSSEIN, M. — Ambilhar in the treatment of schistosomiasis mansoni. *J. trop. Med. Hyg.* 70:255-258, 1967.
12. JANSSENS, P. G.; MUYNCK, A. de; VAN ROS, G.; GIGASE, A. P. & VAN MEIRVENNE, N. — Niridazole (Ambilhar) en schistosomiasis-behandeling. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 47:455-490, 1967.
13. LAMBERT, C. R. — Chemotherapy of experimental *Schistosoma mansoni* infections with a nitrothiazole derivative, Ciba 32,644-Ba. *Ann. Trop. Med. & Parasit.* 58:292-303, 1964.
14. McMAHON, J. E. — Ambilhar in the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in school children. *E. Afr. Med. J.* 44:209-214, 1967.
15. PACKCHANIAN, A. — Chemotherapy of experimental Chagas' disease with nitrofurane compounds. *Antibiot. & Chemother.* 7:13-23, 1957.
16. PIZZI, T. — Un derivado imidazólico efectivo en el tratamiento de las infecciones experimentales por *Trypanosoma cruzi*. (Comunicación Preliminar). *Bol. Chil. Parasit.* 16: 35-37, 1961.
17. POWELL, S. J.; WILMOT, A. J.; MAC LEAD, I. et al. — The effect of a nitro-thiazole derivative, Ciba 32,644-Ba, in amebic dysentery and amebic liver abscess. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 15:300-302, 1966.
18. PRATA, A.; MACHADO, R. & MACEDO, V. — Treatment of schistosomiasis mansoni with a new nitrothiazole derivative, Ciba 32,644-Ba. *Acta Trop. (Basel) Suppl.* 9:180-186, 1966.
19. ROMERO, J. — Comunicación personal.
20. SILVA, L. H. & NUSSENZWEIG, V. — Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol. (São Paulo)* 20:191-208, 1953.
21. VELÁSQUEZ-ANTICH, A. — Suppressive effect of 32,644-Ba "Ambilhar" (1-(5-nitro-2-thiazolyl)-2-imidazolidinone) on experimental acute *S. cruzi* infection in mice. (Preliminary Communication). *Acta Trop. (Basel)* 26:275-276, 1969.
22. VELÁSQUEZ-ANTICH, A. — Efectos antichagásicos de dos nitroimidazoles, BT-982 y BT-985, experimentalmente en el ratón. (Aún no publicado).

Recebido para publicação em 26/11/1969.