

32. Salud Humana

Estudios bioanalíticos en la farmacología del paciente coinfectado Chagas/HIV.

Fleitas Ulises; u.f.8490@gmail.com; Fernández, Marisa; Prospitti Anabella; Marson María Elena; Mastrantonio, Guido; Garcia Bournissen Facundo.

Universidad Nacional de La Plata-CIC-CONICET-Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez-
Hospital de Infecciosas Dr. Muñiz- INP Fatała Chabén

Resumen

En Argentina se estiman en 126.000 a las personas infectadas con HIV y en 1.600.000 a las infectadas con *Trypanosoma cruzi* y no es infrecuente en la práctica clínica el diagnóstico de coinfección. Las reactivaciones por *T. cruzi*, como infecciones oportunistas tiene una mortalidad de entre 79 y 100%, indicando ser una situación de altísimo riesgo para el paciente. El tratamiento farmacológico tripanocida con Benznidazol (BNZ) en la fase crónica es una estrategia para reducir el riesgo de la reactivación en pacientes con HIV. Sin embargo, la información sobre la interacción del BNZ, con los medicamentos antirretrovirales es inexistente, escaso el conocimiento respecto de la cinética parasitaria y viral y su asociación con la clínica en los pacientes coinfectados.

Objetivos y Metodología:

Revalidar bioanalítica para medir BNZ en plasma y líquido céfalo raquídeo (LCR) mediante HPLC/UV/MS-MS, en presencia de antirretrovirales, y su adecuación como método multianálisis para estudios farmacocinéticos y farmacológicos.

Evaluar muestras de pacientes HIV seropositivos y Chagas en su etapa silenciosa y pacientes HIV inmunodeprimidos con Chagas reactivado, ambos bajo tratamiento con BNZ y comedición antirretroviral.

Resultados

De muestras de 7 pacientes en distintos estadios de la enfermedad: dos muestras de LCR presentaron valores de BNZ bajos ($< 1 \mu\text{g/mL}$) y el resto presentó niveles no detectables. De las muestras de plasma cerca del 70% presentaron concentraciones por encima del valor asumido como tripanocida ($2 \mu\text{g/mL}$). La información generada y su vinculación con la clínica pretenden aportar a la mejora de los protocolos preventivos del tratamiento en pacientes HIV seropositivos.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, HIV, coinfección, Benznidazol.

Introducción

Actualmente existen dos fármacos con actividad tripanocida, benznidazol (BNZ) y nifurtimox, aprobados para su uso en seres humanos para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas (ECh). Ambos medicamentos son eficaces para curar la enfermedad en la etapa aguda, aunque la eficacia disminuye a medida que la enfermedad evoluciona a etapas de cronicidad. En las reactivaciones, el tratamiento tripanocida debe iniciarse de manera inmediata.^{3,5,7,8}

Se estima que en Argentina existen 1.600.000 infectados por *T. cruzi*²⁴ y 126.000 infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).¹¹ Suponiendo independencia de los factores de riesgo de infección entre una y otra población, el universo de personas coinfectadas en Argentina sería del orden de 4.500 personas. Son escasos los datos de prevalencia en Argentina de ambas infecciones simultáneas, reportándose valores de entre 3 y 7,8% para prevalencia de *T. cruzi* en población con VIH, consistentes con el valor estimado.^{2,10,11}

Los pacientes coinfectados pueden presentar reactivaciones por *T. cruzi*, consideradas infecciones oportunistas y que han sido reportadas en la literatura científica desde 1990.⁹ Se define a la

reactivación como la detección de *T. cruzi* por examen microscópico de la sangre periférica o del líquido cefalorraquídeo.²¹ Habitualmente las reactivaciones en pacientes VIH con grave inmunocompromiso se presentan como meningoencefalitis difusa aguda y/o miocarditis.

La mortalidad reportada en Argentina para la reactivación es de entre el 79 y el 87,5%, 5,22 y en una revisión en Brasil dio a la coinfección *T. cruzi*/VIH una sobrevida promedio de 10,6 meses, 7 indicando que este cuadro es una situación de altísimo riesgo para el paciente.

Este escenario de mal pronóstico ante una posible reactivación por *T. cruzi* en pacientes VIH, hace necesario definir estrategias para su prevención. Se han sugerido estrategias de terapia anticipada ("preemptive therapy") que consiste en el monitoreo de cargas parasitológicas e inicio de tratamiento tripanocida ante el aumento de la misma, previo a la visualización del parásito por métodos tradicionales.⁸ Esta es la misma estrategia utilizada en el modelo de pacientes trasplantados con inmunodepresión inducida, donde en una serie de casos se demostró que anticipa el diagnóstico convencional de reactivación de la ECh en aproximadamente un mes.⁶ Esta estrategia ya es ampliamente

utilizada y tiene excelentes resultados para el manejo de pacientes con trasplante e infección por citomegalovirus.²³ Sin embargo, para *T. cruzi* aún faltarían mayores datos para su validación, ya que las PCR pueden ser positivas en pacientes con infección crónica por *T. cruzi*, sin ningún inmunocompromiso y sin ninguna reactivación.

Nuestra propuesta es la aplicación de un protocolo farmacológico tripanocida en pacientes con VIH e infección crónica por *T. cruzi*, para potencialmente reducir el riesgo de reactivación, independientemente del grado de inmunocompromiso. Esto se sustenta en las guías y recomendaciones nacionales e internacionales sobre la ECh, donde el tratamiento tripanocida es una opción en pacientes adultos con infección crónica; y se justifica en estudios donde se aportan datos consistentes sobre el efecto tripanocida del BNZ en población adulta con ECh crónica.^{4,17,18}

Sin embargo, siendo escasos los datos respecto de la farmacocinética y la farmacodinamia del BNZ,^{1,12} son inexistentes aquellos referidos a la interacción farmacológica entre el BNZ y los antiretrovirales o a los eventos adversos del BNZ bajo las condiciones descriptas. Tampoco existen metodologías analíticas que permitan un

seguimiento farmacocinético de la terapéutica.

El escaso desarrollo analítico aplicado a drogas antichagásicas, ha sido en buena parte aportada por investigadores integrantes de nuestro grupo de trabajo^{12-15,19} pero no se han evaluado las drogas antirretrovirales como posibles interferencias bioanalíticas, dato clave a la hora de validar los dosajes de estos fármacos y sustentar sobre bases firmes las conclusiones farmacológicas.

Objetivos

Revalidación bioanalítica para medir BNZ en plasma y líquido céfalo raquídeo (LCR) mediante HPLC/UV/MS-MS, en presencia de antiretrovirales, y su adecuación como método para estudios farmacocinéticos y farmacológicos de pacientes comedicados.

Evaluar muestras de pacientes HIV seropositivos y Chagas en su etapa silenciosa y pacientes HIV inmunodeprimidos con Chagas reactivado, ambos bajo tratamiento con BNZ y comedicación antiretroviral.

Materiales y Métodos

Revalidación del método bioanalítico diseñado para la medición de BNZ en plasma:

Se estudió su papel como interferencias analíticas en la determinación de BNZ para un conjunto de fármacos coexistentes en la práctica médica habitual en pacientes coinfectados Chagas/HIV, en esta instancia en pacientes con reactivación de la infección por T. cruzi.

Estos fármacos incluyeron antibióticos, antiparasitarios y antifúngicos (sulfadiazina, sulfametoxazol, trimetoprima (cotrimoxazol), anfotericina, fluconazol, clindamicina, pirimetamina, nitazoxanida, , ciprofloxacina, cefepime y azitromicina), antiretrovirales (levetiracetam, TDF/3TC, ATV/r y ganciclovir), anticonvulsivantes y psicotrópicos (fenitoina, fentanilo, lorazepam, clonazepam y amitriptilina), corticoides (dexametasona, prednisona y meprednisona,), antieméticos y otros coadyuvantes terapéuticos (metoclopramida, leucovorina, ácido fólico y escopolamina), AINEs (ibuprofeno) y antihistamínicos (ranitidina y fexofenadina).

Revalidación del método bioanalítico diseñado para la medición de BNZ en plasma, para ser utilizado con la matriz LCR. Debido a la naturaleza de la matriz utilizada y de que los métodos de obtención de la misma resultan medianamente invasivos, es que se trabajó en una primera instancia con

muestras de LCR bovino (no medicado), donado como una colaboración de colegas de la Facultad de Veterinaria de la UNLP.

Resultados y Discusión

Para la dilucidación de las interferencias se estudiaron las propiedades analíticas de cada una de estas sustancias en el contexto del método cromatográfico ya puesto a punto por el grupo, que incluyeron los tiempos de retención y los perfiles de absorbancia.

El análisis consistió en la preparación de soluciones de patrones analíticos a partir de las drogas puras, para su evaluación cromatográfica bajo las condiciones de trabajo que para el método de cuantificación de BNZ.

Se descartaron como posibles interferentes a la gran mayoría de las drogas evaluadas (presentadas en el punto anterior). Se continuó con estudios alternativos para el caso de Fluconazol y Sulfametoxazol. Para los cuales se armaron curvas de calibración para ambos fármacos en conjunto con concentraciones constantes de BNZ.

Finalmente se concluyó que a las condiciones de trabajo del método para la cuantificación de BNZ y en el rango clínico de concentraciones del mismo, ambos fármacos no presentaron interferencias

que sean significativas en la cuantificación del BZN.

Para las evaluaciones en la matriz LCR:

Se abordó con estas muestras el proceso de extracción y cuantificación de una serie de curvas de calibración. Se abarcó un rango de concentraciones lo suficientemente amplio debido a la falta de información existente respecto a las concentraciones de BNZ esperadas en dicha matriz.

La respuesta analítica de estos ensayos fue positivas, arrojando curvas de calibración con parámetros aceptables para ser utilizados en la cuantificación de BNZ en muestras de pacientes coinfectados, polimedicados.

Se presentan los parámetros de las curvas de calibración de la misma:

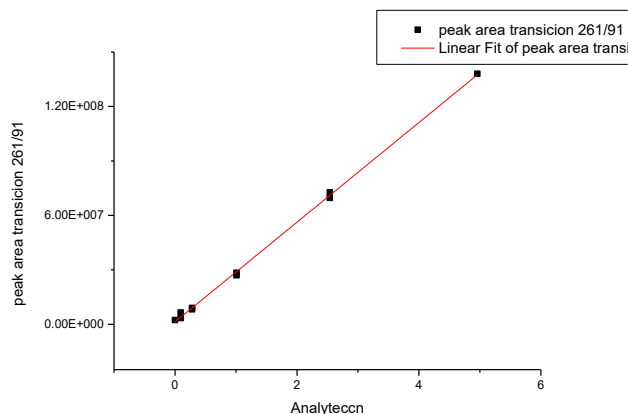
Parámetros curvas: LCR BZN transición 261/91:

cc teórica (ng/mL)	área pico transición 261/91
0	2.35E+06
0.094	3.37E+06
0.094	6.48E+06
0.282	8.18E+06
0.282	9.01E+06
1.01	2.70E+07
1.01	2.84E+07
2.54	7.27E+07
2.54	6.96E+07
4.96	1.38E+08

	Valor	Standard error	(ng/mL)
Ord Origen	1.3335E6	627327.21851	LOD: 0.0754
Pendiente	2.74551E7	314760.4143	LOQ: 0.2056

Number of Points	10
Degrees of Freedom	8

Residual Sum of Squares	1.8473E13
Adj. R-Square	0.99882

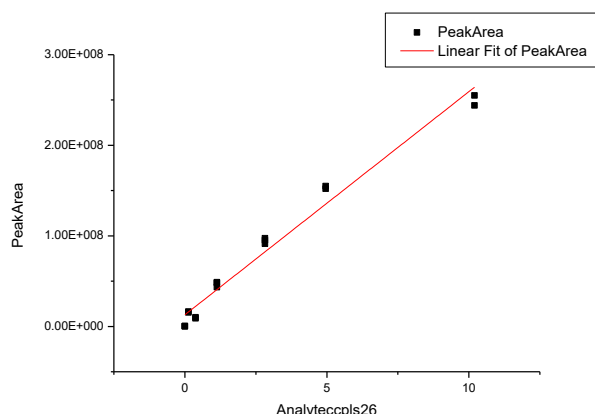


Parámetros curvas: Pls BZN transición 261/91:

cc teórica (ng/mL)	área pico transición 261/91
0	1.98E+05
0	5.00E+05
0	3.75E+05
0.125	1.54E+07
0.125	1.65E+07
0.376	8.98E+06
0.376	1.02E+07
1.13	4.88E+07
1.13	4.33E+07
1.13	4.81E+07
2.82	9.74E+07
2.82	9.13E+07
2.82	9.53E+07
4.96	1.55E+08
4.96	1.52E+08
10.2	2.55E+08
10.2	2.44E+08

	Valor	Standard error	(ng/mL)
Ord Origen	1.28806E7	4.03937E6	LOD: 0.5411
Pendiente	2.46313E7	986049.20434	LOQ: 1.4759

Number of Points	17
Degrees of Freedom	15
Residual Sum of Squares	2.56173E15
Adj. R-Square	0.97496



Se midió BNZ en 18 muestras de plasma y 5 muestras de LCR de siete pacientes con reactivación de la enfermedad de Chagas bajo tratamiento en contexto de internación por la gravedad del cuadro clínico.

El rango de concentración hallado para BNZ fue de (0.1 - 9.4)($\mu\text{g}/\text{mL}$) para las muestras de plasma y de (LDD - 0.1)($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Conclusiones

Se pretende aportar elementos para evaluar si la estrategia de tratamiento tripanocida durante la fase crónica reduce el riesgo de reactivación de *T. cruzi* en el seguimiento prolongado en la coinfección con VIH.

Se propone continuar y contrastar los resultados bioanalíticos con datos clínicos y farmacológicos y con la dinámica de las cargas parasitarias medidas por PCR evaluadas en la fase prospectiva de estudio clínico próxima a iniciarse en

pacientes coinfectados sin reactivación de la enfermedad de Chagas.

Dado que la farmacología de las drogas antirretrovirales es mejor conocida, los datos obtenidos en pacientes medicados simultáneamente con éstos y BNZ, complementan la escasa información existente respecto de este último, por ejemplo en cuanto a cuáles son las vías metabólicas principales para la eliminación del BNZ.

Es decir, con los datos de interacción farmacocinética, podrían establecerse hipótesis respecto de cuáles son las enzimas involucradas en el metabolismo del BNZ.

La información que se desprenda pretende profundizar situaciones particulares respecto a la farmacología de las drogas antirretrovirales en pacientes tratados con BNZ, aportando también a la mejora de los protocolos preventivos del tratamiento en pacientes VIH seropositivos. El modelo de trabajo propuesto es también extrapolable a otros contextos en donde se requiere el tratamiento con BNZ en pacientes inmunodeprimidos, como es el caso de los pacientes trasplantados, diagnosticados con ECh en una etapa silenciosa de la infección, que se encontrarán en un gran riesgo de reactivación frente al tratamiento de soporte con inmunodepresores.

Bibliografía

1. Altcheh J et al. PLoS Neglected Tropical Diseases (2014) 8(5): e2907.
2. Arias L. Rev Arg Parasitol 2012 1: 117-118
3. Auger S et al. Rev. Argent. Cardiol. v.73 n.6 Buenos Aires nov./dic. 2005
4. Clinicaltrials STOP CHAGAS. clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01377480
5. Cordova E et al. Int J Infect Dis. 2008 Nov;12(6):587-92.
6. Cura CI et al. Am J Transplant. 2013 Dec;13(12):3253-61. doi: 10.1111/ajt.12487
7. de Almeida EA et al. Rev Soc Bras Med Trop 44(6):762-770, nov-dez, 2011
8. de Freitas VLT et al. (2011) PLoS Negl Trop Dis 5(8): e1277.
9. Del Castillo M et al. Am J Med 1990; 88:693-94
10. Diez M et al. Medicina (B Aires) 2001; 61: 376-380
11. Dolcini G et al. Rev Arg Microbiol 2008; 40: 164-166
12. García-Bournissen F et al. Archives of Disease in Childhood. (2015) 100(1):90-94.
13. Marson ME et al. Journal of Clinical Laboratory Analysis (2013) 27:384-390.
14. Marson ME et al. Therapeutic Drug Monitoring (2013) 35:522-526.
15. Martínez N et al. Talanta (2015) 131:656-660.
16. Min. de Salud de la Nación. Boletín sobre el VIH-sida e ITS en la Argentina 2015, 32: 4-5.
17. Molina I et al. N Engl J Med. 2014 Sep 4;371(10):966. doi: 10.1056/NEJMc1407914
18. Morillo CA et al. N Engl J Med. 2015 Oct;373(14):1295-306. doi: 10.1056/NEJMoa1507574
19. Padró JM et al. Talanta (2013) 107:95-102.
20. Ramírez JC et al (2015). J Mol Diagn 17: 605-615.
21. Sartori A et al. Clin Infect Dis 1995; 21:1297-99
22. Sztokhamer D et al. Actualizaciones en SIDA. Buenos Aires. (2010) 18(68):49-54.
23. Torre-Cisneros J et al. Transplant Rev (Orlando). 2016 Jul; 30 (3):119-43.
24. WHO - World Health Organization 2015. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Wkly Epidemiol Rec 6: 33-44.

Agradecimientos

Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP
Unidad Plapimu/Laseisic- CICpBA

Financiamiento

Subsidio Bunge y Born para Investigación en Enfermedad de Chagas 2017-2018.