



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA
MENCION MICROBIOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL EFECTO *in vitro* DE 20-PIPERIDIN-2-IL-5 α -PREGNANO-
20(R)-3 β -DIOL (AZA1) y 22-PIPERIDIN-3-IL-PREGNANO-22(S)-3 β -DIOL
(AZA3) SOBRE AISLADO DE *Trypanosoma cruzi* DE ZONA
ENDÉMICA DEL ESTADO PORTUGUESA

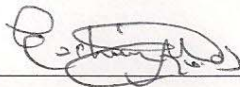
LIC. CARLOS EDUARDO MÁRQUEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGÍA
APLICADA MENCION MICROBIOLOGIA

CUMANÁ, OCTUBRE 2009

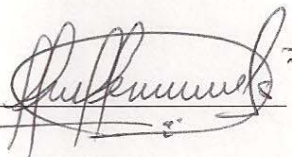
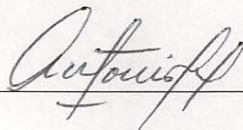
EVALUACIÓN DEL EFECTO *in vitro* DE 20-PIPERIDIN-2-IL-5 α -PREGNANO-
20(R)-3 β -DIOL (AZA1) y 22-PIPERIDIN-3-IL-PREGNANO-22(S)-3 β -DIOL
(AZA3) SOBRE AISLADO DE *Trypanosoma cruzi* DE ZONA
ENDÉMICA DEL ESTADO PORTUGUESA

APROBADO POR:



Prof. Edgard Marchán Marcano, Ph. D.

Asesor



INDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	9
Drogas.....	9
Benznidazole (Rochagan®).....	9
Material biológico.....	9
Evaluación de la respuesta dosis-dependiente.....	10
Determinación de las concentraciones efectivas	10
Cálculo de factores de crecimiento.....	10
Cálculo de concentraciones inhibitorias de crecimiento:	11
Cálculo de la concentración mínima inhibitoria:.....	11
Cálculo de la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento	11
Extracción de lípidos totales.....	12
Lípidos neutros	12
Purificación y caracterización de esteroides libres.....	13
Determinación de la citotoxicidad de las drogas.	15
Análisis estadístico	17
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	31

CONCLUSIONES.....	39
RECOMENDACIONES	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41
HOJA DE METADATOS.....	55

DEDICATORIA

A mi Dios, todo poderoso, por la vida de cada día y por darme tantas cosas hermosas como mi familia y mis amigos, además de las grandes oportunidades que me ha brindado y que me han permitido crecer.

A mis hijos, que llenan todos mis espacios, la alegría más grande de mi vida y mi razón de ser. Por ellos, todo.

A mi madre, quien ha sido mi guía y mi orgullo, por hacer de mí la persona que soy.

A mi esposa, mi amor, mi compañía, mi amiga, mi confidente, mi apoyo y mi todo. Contigo, toda la vida.

A mis hermanos, a quienes quiero, respeto y admiro por seguir siempre los ejemplares caminos de la buena voluntad.

Al profesor Edgar Marchan, ejemplo de preparación a seguir en la vida, por su constancia, su educación, sus ánimos para enseñar y sus originales métodos y, sobre todo, por saber llevar todo ese trabajo a la par de su bella familia. Y por confiar en mí por encima de cualquier situación adversa. Este logro también es suyo.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, profesor Edgar Marchan, por su valiosa orientación, y por transmitirme los conocimientos necesarios para la realización de este trabajo, además de sus oportunos consejos en difíciles situaciones.

A la profesora Zulay Simoni, una gran amiga, al colaborar conmigo en todo momento, una excelente profesional con brillante inteligencia, que me ha facilitado sus conocimientos durante todo el desarrollo de esta tesis.

AL Dr. Gonzalo Visba, del Centro de Química del IVIC, por brindarme su gran apoyo técnico y conocimiento científico para realizar las extracciones de esteroides, su caracterización y cuantificación; además de donar gentilmente los compuestos azasteroides utilizados en esta investigación.

Al Dr. Victor Contrera y a todo el equipo técnico del Instituto de Biología molecular de Parásitos de la Universidad de Carabobo, por prestar sus instalaciones durante el entrenamiento de cultivos *in vitro*, necesarios para realizar las pruebas de citotoxicidad.

Al Lcdo. Antonio Gómez por todo el apoyo técnico, científico y personal que me brindó de forma incondicional durante mi estancia en el Laboratorio de Biología Molecular del IIBCAUDO.

A todo el equipo de trabajo del IIBCA y del Postgrado de Biología Aplicada de la Universidad de Oriente, por todo el apoyo institucional brindado para la culminación de esta investigación.

A mis compañeros de estudio del postgrado de Biología Aplicada: Yusulbeht, Rosianny, Alberto, Marieugenia, Haidee e Yleana.

A todos, muchas gracias.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de 20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(R)-3 β -diol (AZA1) y 22-piperidin-3-il-pregnano-22(S)-3 β -diol (AZA3) en la composición de lípidos neutros (% de masa) de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado B28V506). Periodo de exposición de 120h.....	23
--	----

LISTA DE FIGURAS

Ilustración 1. Efecto de benznidazole sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado B28V506).	19
Ilustración 2. Curva dosis-respuesta para la estimación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Inhibitoria del 50% (CI50) de benznidazol, a las 120 horas post-tratamiento.	19
Ilustración 3. Efecto de 20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(R)-3 β -diol sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado B28V506).	20
Ilustración 4. Curva dosis-respuesta para la estimación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Inhibitoria del 50% (CI50) de AZA1 a las 120 horas post-tratamiento.	20
Ilustración 5. Efecto de 22-piperidin-3-il-pregnano-22(S)-3 β -diol sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado B28V506).	21
Ilustración 6. Curva dosis-respuesta para la estimación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Inhibitoria del 50% (CI50) de AZA3, a las 120 horas post-tratamiento.	21
Ilustración 7. Ultraestructura de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado B28V506) sin tratamiento. N: núcleo; K: kinetoplasto; M: mitocondria; BF: bolsa flagelar.	25
Ilustración 8. Ultraestructura de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado B28V506) con CI32 de AZA1 durante 120h. N: núcleo. \rightarrow : evaginación.	26
Ilustración 9. Ultraestructura de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado B28V506) tratadas con CI16 de AZA3 durante 120h. V: vacuolas. M: mitocondria. 1	
Ilustración 10. Ultraestructura de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado B28V506) tratados con CI32 AZA3 durante 120h. M: mitocondria.	1

Ilustración 11. Ultraestructura de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado B28V506) tratados con CI32 de AZA3 durante 120h. V: vacuola. →: evaginación. 29

Ilustración 12. Efecto de 18 μ M (CMI) de 20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(r)-3 β -diol y 2,3 μ M (CMI) de 22-piperidin-3-il-pregnano-22(S)-3 β -diol en células Vero durante 48 h..... 30

RESUMEN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una zoonosis producida por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi* que constituye un grave problema de salud pública en América Latina. Las drogas comúnmente utilizadas para su tratamiento, Benznidazol y Nifurtimox, son efectivas sólo en la fase aguda e inducen serios efectos colaterales, que pueden conllevar a la interrupción del tratamiento. En este sentido, se evaluó el efecto *in vitro* de 20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(R)-3 β -diol (AZA1) y 22-piperidin-3-il-pregnano-22(S)-3 β -diol (AZA3) como posibles inhibidores de la $\Delta^{24(25)}$ -esterol metiltransferasa (24-EMT), sobre epimastigotes de *T. cruzi* (aislado B28V506) de una región endémica del estado Portuguesa; mantenidos en fase exponencial en medio LIT suplementado con suero fetal bovino 10% a 26° C, con agitación. Para ello, se determinó la densidad celular por conteo directo en cámara de Neubauer e indirectamente por espectrofotometría a 560 nm. La viabilidad, se cuantificó por el método de exclusión con azul de tripano. La purificación de esteroides libres, se hizo mediante cromatografía en columna con ácido silícico, mientras que la caracterización y cuantificación por cromatografía de gases y espectrometría de masas. La ultraestructura, se realizó por métodos convencionales para microscopía electrónica de transmisión. Asimismo, la citotoxicidad de los azasteroides sobre células Vero, se determinó mediante cuantificación de viabilidad por exclusión de azul de tripano. Se encontró a las 120 h un efecto antiproliferativo dosis-dependiente sobre epimastigotes de *T. cruzi* y se estimaron para BZN (CMI: 29,2 μ M y CI₅₀: 15,7 μ M); AZA1 (CMI: 18,2 μ M y CI₅₀: 10,6 μ M) y para AZA3 (CMI: 2,3 μ M y CI₅₀:1,45 μ M). Los azasteroides indujeron gran acumulación de zimosterol, no detectado en parásitos no tratados con disminución drástica de los esteroides esenciales tipo ergosta, acompañado de alteraciones ultraestructurales considerables apenas con una CI₁₆, como evaginaciones en la membrana plasmática, vacuolización y pérdida de la integridad mitocondrial. Con las CMI de AZA1 y AZA3 en células Vero, se encontró un bajo efecto citotóxico en relación a células no tratadas. Estos hallazgos sugieren que la potente actividad tripanocida (12.7 veces AZA3 y 1.6 veces AZA1, mayores que la droga de tratamiento convencional BZN) podría estar asociada con la inhibición de la actividad de la enzima 24-EMT, específica de estos eucariotes inferiores, lo cual es soportado por su baja toxicidad en células Vero, constituyendo así una herramienta prometedora en la búsqueda de nuevas drogas que permitan resolver el grave problema de salud pública que representa la enfermedad de Chagas en América Latina.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una zoonosis producida por el protozooario flagelado *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*, descrito por primera vez en 1909 por Carlos Chagas, en Minas Gerais, Brasil. Es una enfermedad crónica debilitante que afecta la salud, el bienestar y la productividad de un gran número de habitantes, representando un problema de salud pública en América Latina (WHO, 2002).

La infestación ocurre principalmente por el contacto de la piel o mucosas de seres humanos u otros mamíferos con heces de insectos hemípteros, hematófagos obligatorios de la subfamilia Triatominae, géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus* que contienen formas infectantes (tripomastigotes metacíclicos) de *Trypanosoma cruzi*. Los tripomastigotes se introducen en las células del tejido celular laxo, vecino al sitio de la penetración y adquieren la forma de amastigotes (Anexo1). Los amastigotes se multiplican por fisión binaria, exponencialmente, hasta que terminan por romper la célula, y se liberan a la circulación sanguínea bajo la forma de tripomastigotes. El ciclo se completa cuando los tripomastigotes son ingeridos por el insecto vector al succionar sangre de mamíferos infectados (WHO, 2002).

Las fases clínicas de la enfermedad se caracterizan por un período de incubación que en los casos de transmisión vertical oscila entre 5 y 12 días, mientras que en el caso de la transmisión por transfusión de sangre o plasma, los primeros síntomas aparecen entre los 25 a 45 días. Luego una fase aguda, donde persiste el parásito en sangre, y se caracteriza por síntomas generales como fiebre, decaimiento, anorexia, astenia, vómitos, diarrea, cefalea, raquialgia, irritabilidad, inquietud, convulsiones, tos, palpitaciones, etc. Una fase indeterminada silenciosa, latente o

indeterminada, con ausencia de parásitos en sangre, la cual generalmente es asintomática. Y finalmente una fase crónica sintomática caracterizada por arritmias, insuficiencia cardíaca y fenómenos tromboembólicos, donde son frecuentes palpitaciones, mareos, síncope, disneas. De igual forma, en algunos países del cono sur americano, como es el caso de Brasil, la tripanosomiasis se presenta con alteraciones a nivel del tracto digestivo como son megaesófago y megacolon, caracterizados por disfagia, principalmente para sólidos y comidas frías; odinofagia, regurgitación, estreñimiento severo (desde pocos días hasta 2-3 meses), dolor abdominal frecuentemente asociada con episodios de obstrucción de la vejiga (Coura *et al.*, 2002).

En las áreas tradicionalmente endémicas y en nuevas áreas, se presenta la mayoría de las 200 000 nuevas infecciones que ocurren anualmente en América Latina, de acuerdo a la incidencia estimada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el año 2000 (WHO, 2002).

Para el año 2007 se estimaba que existían entre 15 a 16 millones de personas infectadas desde México hasta Argentina y que entre 75 a 90 millones se encontraban en riesgo de infección, además se estimaba que unos 6 a 8 millones de personas tenían alguna manifestación clínica de la forma crónica de la enfermedad (Coura, 2007).

En Venezuela, la enfermedad de Chagas es endémica principalmente en zonas rurales de la mayor parte del territorio nacional (Añez *et al.*, 1999). Según un informe publicado por la OMS (2006), los estados con mayor tasa de prevalencia en el período 1992-2000 fueron Carabobo (35,7%), Lara (15,8%), Anzoátegui (9,9%), Portuguesa (9,7%), Táchira (9,5%) y Cojedes (8,9%) (WHO, 2006). Figuera *et al.* (2006) en un estudio realizado en zonas rurales del estado Sucre en el año 2005 reportaron una seropositividad de 25%.

Recientemente un brote de Chagas en una escuela de una zona urbana del municipio Chacao del estado Miranda, probablemente por contaminación vía oral, arrojó un total de 126 casos, de los cuales uno falleció (Garrido *et al.*, 2007).

Aunque la participación de *T. cruzi* en la fase aguda de la enfermedad de Chagas es ampliamente aceptada, el papel del parásito en el origen de las manifestaciones patológicas de la fase crónica ha sido muy controversial, ya que desde los años 70 numerosos estudios demostraban que eran de origen autoinmune. Dicha hipótesis se basaba principalmente en la aparente ausencia de parásitos en las lesiones inflamatorias en el miocardio y tracto gastro-intestinal de pacientes crónicos (Cunha-Neto *et al.*, 1995; Kalil y Cunha-Neto, 1996; Brener y Gazzinelli, 1997; Cançado, 1999; Tarleton y Zhang, 1999; Tarleton, 2001; Engman y Leon, 2002).

Sin embargo la hipótesis del origen autoinmune de la enfermedad de Chagas ha sido seriamente cuestionada por resultados de muchos estudios que demostraron que la persistencia del parásito en miocardio en la etapa crónica de la enfermedad, es responsable en estos tejidos infectados del desencadenamiento de la respuesta inflamatoria tisular, caracterizada por infiltrados. Experiencias de la última década y múltiples investigaciones indican que la eliminación del *T. cruzi* de los pacientes infectados es un prerrequisito para detener la evolución de la enfermedad y evitar consecuencias terminales. Así, el consenso que ha prevalecido es que esta dolencia debe ser tratada como una enfermedad parasitaria, no autoinmune (Luquete, 1997; Sosa Estani y Segura, 1999; Tarleton, 2001; Urbina y Docampo, 2003).

Las drogas comúnmente usadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el Nitroimidazol: Benznidazol (Rochagan[®], Radanil[®] Roche) y el Nitrofurano: Nifurtimox (Lampit[®], Bayer) cuya actividad anti-*T. cruzi* fue descubierta empíricamente hace más de tres décadas (Docampo, 1990). Estos compuestos

inducen serios efectos colaterales, que incluyen anorexia, vómitos, polineuropatías periféricas y dermatopatías alérgicas, que pueden conllevar a la interrupción del tratamiento (Cançado, 1999).

El benznidazole (Anexo 2) actúa por reacción de sus derivados nitroreducidos con macromoléculas como ADN, ARN, proteínas y posiblemente lípidos insaturados. El tratamiento antiparasítico con este producto en pacientes crónicos, aunque incapaz de inducir cura parasitológica en la mayoría de los casos, conlleva a una marcada reducción en la ocurrencia de cambios electrocardiográficos y a una menor frecuencia de deterioro del cuadro clínico de los pacientes (Viotti *et al.*, 1994; Bahia-Oliveira *et al.*, 2000).

El nifurtimox (Anexo 3) actúa por reducción del grupo nitro de la molécula a radicales nitroaniónicos, que a su vez reaccionan con el oxígeno molecular para generar metabolitos altamente tóxicos (anión superóxido, peróxido). *T. cruzi* es deficiente en algunos de los mecanismos de detoxificación de metabolitos de oxígeno, particularmente del peróxido de hidrógeno, y es por ello más susceptible al stress oxidativo que las células de vertebrados (Docampo, 1990).

La eficacia antiparasitaria de estos compuestos varía según la región geográfica, probablemente como resultado de la diferente susceptibilidad intrínseca a las drogas y del genotipo de *T. cruzi* que circulan en diferentes zonas endémicas. Ambas drogas son activas en la fase aguda hasta con un 80% de éxito terapéutico, con cura parasitológica radical indicada por negativización de todas las pruebas parasitológicas y serológicas. Sin embargo, la mayor limitación de estos tratamientos es su baja eficacia en la fase crónica de la enfermedad ($\geq 80\%$ de fracasos terapéuticos), que es la forma clínica más frecuente en Latinoamérica (Andrade *et al.*, 1992; Cançado, 1999).

Por otra parte, en kinetoplastidas la ruta de biosíntesis de esteroides adquiere gran importancia, debido a que conduce a la síntesis de ergosterol, el principal esteroide en estos parásitos y en hongos, el cual difiere en su estructura, del colesterol, esteroide mayoritario en células de mamíferos. Debido a la importancia que representa el ergosterol para los Kinetoplastidas, la inhibición de la ruta de biosíntesis se ha convertido en las últimas décadas en una alternativa de gran interés en la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes antiproliferativos (Urbina, 1997, Urbina, 2002; Urbina y Docampo, 2003). Considerando estos aspectos, toma vigencia e importancia el concepto de quimioterapia racional, el cual se fundamenta en el hecho de que una vez conocidas las bases bioquímicas y moleculares de agentes causales de enfermedades, es posible establecer diferencias claves entre estos y sus hospederos, y determinar blancos específicos de acción de drogas que dañen el parásito sin afectar el hospedero.

La síntesis de esteroides (Anexo 4) es una de las rutas metabólicas más complejas presentes en células eucariotas, en la que se dan una serie de reacciones que pueden agruparse en tres grandes etapas: en la primera reacción el acetil-coA se convierte en mevalonato por acción de la enzima HMG-coA reductasa. Luego el mevalonato es transformado en escualeno, regulado por un conjunto de enzimas, principalmente la escualeno sintetasa (SQS) y por último ocurre la conversión de escualeno a colesterol, o a ergosterol, y es en esta etapa donde se ponen de manifiesto las diferencias entre la ruta de biosíntesis de esteroides de mamíferos y en eucariotes inferiores (Bach *et al.*, 1999; Chappell *et al.*, 1995; Basson *et al.*, 1986).

El escualeno sufre un proceso de ciclación para dar lugar a lanosterol, molécula de 30 carbonos, que tras varias reacciones en las que pierde tres grupos metilo da lugar al colesterol en células de mamíferos. Sin embargo, en kinetoplastidas el lanosterol sigue una ruta diferente, ya que además de ser desmetilado en posición 4 y 14, es metilado en posición 24, catalizado por la enzima $\Delta^{24-(25)}$ -esteroide

metiltransferasa (EMT), que es dependiente de S-adenosil-L-metionina (AdoMet), y es característica de tripanosomátidos, hongos y plantas (Gelb *et al.*, 1998),

Algunos compuestos azoles, probados en kinetoplastidas tienen la capacidad de actuar sobre la C-14 demetilasa, impidiendo la demetilación del lanosterol, bloqueándose así, la transformación de éste en ergosterol, sin que puedan utilizar el suplemento abundante de colesterol presente en sus hospederos mamíferos (Urbina, 1997).

Por otra parte, la 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxiquinuclidina (BPQ-OH), un potente inhibidor no competitivo de la escualeno sintetasa (SQS), ha sido evaluada como posible blanco quimioterapéutico en *T. cruzi*. Este induce una reducción dosis-dependiente de la proliferación de estos parásitos asociado con una completa desaparición de escualeno y esteroides endógenos, resultando en un bloqueo de la biosíntesis de esteroides a nivel de la SQS (Urbina *et al.*, 2002).

Existen otros potentes inhibidores de la biosíntesis de esteroides como el E5700 y el ER-119884, derivados de quinuclidina, que inhiben la SQS en mamíferos, los cuales han mostrado potente actividad en *T. cruzi* con valores de K_i en rangos nanomolares y subnanomolares (Urbina *et al.*, 2004).

Bifosfonato Risedronato (Ris) y compuestos relacionados bloquean la biosíntesis de poli-isoprenoides a nivel de la farnesil pirofosfato sintetasa y se han utilizado *in vitro* en *T. cruzi*, demostrando un efecto inhibitorio dosis-dependiente en el crecimiento de los parásitos. Se encontró inhibición total del crecimiento y lisis celular a concentraciones de 150 $\mu\text{mol/L}$ en epimastigotes y 100 $\mu\text{mol/L}$ en amastigotes, que podría estar relacionado con una disminución de los esteroides endógenos del parásito. Además, se observaron alteraciones ultraestructurales tales como volumen celular, desorganización de reservosomas y kinetoplasto, aparición de

vesículas autofágicas y vacuolización progresiva del citoplasma en los parásitos tratados con Ris (Garzoni *et al.*, 2004).

Se ha demostrado también inhibición de la enzima escualeno-2,3-epoxidasa por Terbinafina, inhibición de la 14 α -metilesterol-14-demetilasa por compuestos azoles y triazoles, e inhibición de la $\Delta^{(24)}$ -esterol metil transferasa por azasteroles; asociado con desaparición de esteroides esenciales y acumulación de cantidades anormales de precursores de esteroides, con consecuencias citostáticas o citotóxicas, en parásitos kinetoplastidos (Urbina *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2003).

Los azasteroles (Anexo 5), son esteroides que poseen en la cadena lateral átomos de nitrógeno, los cuales son capaces de bloquear la enzima $\Delta^{24,25}$ esteroil metiltransferasa (EMT) (Anexo 6) en la ruta biosintética del ergosterol (Atencio *et al.*, 2001). Algunos de sus derivados han sido probados en tripanosomatidos, mostrando una potente actividad inhibitoria de la biosíntesis de esteroides en *T. cruzi*, y en algunas especies de *Leishmania* (Urbina *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 2002).

En los últimos 25 años ha ocurrido un enorme avance en el conocimiento de la bioquímica y biología celular de *T. cruzi* y organismos relacionados como *Trypanosoma brucei* y varias especies del género *Leishmania*, incluyendo la secuenciación del genoma completo de esos organismos, recientemente reportado (Berriman *et al.*, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005a,b; Ivens *et al.*, 2005) constituyendo las bases para considerar la quimioterapia racional como una alternativa viable para combatir las enfermedades causadas por kinetoplastidos.

En síntesis, los posibles blancos quimioterapéuticos en el caso del *T. cruzi* han sido químicamente y genéticamente bien caracterizados en modelos experimentales, principalmente la biosíntesis de ergosterol, cruzipaina y el metabolismo de

pirofosfato y tripanotión. Sin embargo, las únicas drogas disponibles actualmente para los pacientes con enfermedad de Chagas siguen siendo las mismas disponibles desde los años 60 y 70 del siglo pasado, con los efectos colaterales indeseables, con mecanismos de resistencia desarrollados por el parásito y una actividad más efectiva en la fase aguda de la enfermedad que en la crónica, alto costo, además de la poca disponibilidad en el mercado por haber sido abandonada su comercialización por trasnacionales farmacéuticas.

Enfocados en las consideraciones anteriormente expuestas, se hace necesario desarrollar nuevas alternativas quimioterapéuticas que permitan contribuir a resolver este grave problema de salud pública. En este sentido se planteó evaluar el efecto *in vitro* de 20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(R)-3 β -diol (AZA1) y 22-piperidin-3-il-pregnano-22(S)-3 β -diol (AZA3), como posibles inhibidores de la enzima 24-EMT (Visbal *et al.*, 2005) sobre aislados de *Trypanosoma cruzi* de una región endémica del estado Portuguesa.

METODOLOGÍA

Drogas

Benznidazole (Rochagan[®])

Este compuesto fue suministrado gentilmente por el Dr. Alvaro José Romanha, Director del Centro de Pesquisas René Rachoud de la Fundación FIOCRUZ-RJ. Minas Gerais, Brasil.

20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(R)-3 β -diol (AZA1) y 22-piperidin-3-il-pregnano-22(S)-3 β -diol (AZA3).

Estos compuestos fueron sintetizados y suministrados gentilmente por el Dr. Gonzalo Visbal del Laboratorio de Productos Naturales y Síntesis Orgánica del Centro de Química, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Material biológico

Se utilizaron epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado B28V506) de *Rhodnius prolixus*, genotipo TcI, capturados en una zona rural del estado Portuguesa, los cuales pertenecen al proyecto nacional de grupo del Fonacit bajo el código G-2005000827 y fueron facilitados gentilmente para la ejecución de esta investigación. Los epimastigotes fueron mantenidos en fase exponencial de crecimiento a partir de 2×10^6 parásitos/ml en medio LIT (Liver Infusion Tryptose), suplementado con suero fetal bovino (GIBCO-BRL) al 10% e incubados a 26°C, en agitación (120 rpm) de acuerdo a las condiciones establecidas por Chiari *et al.* (1984).

Evaluación de la respuesta dosis-dependiente

Las drogas fueron disueltas en dimetil-sulfóxido (DMSO, Sigma, $\leq 1\%$ v/v) y añadidas a los cultivos de *T. cruzi* al alcanzar una densidad celular de 10×10^6 parásitos/ml. Para evaluar la respuesta dosis-dependiente de las drogas, se realizó conteo directo en cámara de Neubauer en microscopio óptico (Olympus, modelo CX31RBSFA), considerando también la morfología y la movilidad de los parásitos, e indirectamente se determinó la densidad óptica (DO) de los cultivos por espectrofotometría a 560 nm, y la densidad celular (DC) se estimó por extrapolación en una curva de calibración (DO vs DC).

Para determinar la viabilidad celular, se utilizó el método de exclusión del colorante azul de tripano, según Kucsera y col., (2000), el cual se fundamenta en la capacidad que tienen las membranas celulares intactas de expulsar de forma activa cualquier colorante e impedir su entrada al citosol. Para ello, se mezclaron volúmenes iguales del colorante y cultivo, incubando durante 5 minutos antes de observarlo al microscopio óptico para su conteo en cámara de Neubauer.

Determinación de las concentraciones efectivas

Cálculo de factores de crecimiento

$$FC = DC_f / DC_i$$

FC: factor de crecimiento

DC_f: densidad celular final

DC_i: densidad celular inicial

Cálculo de concentraciones inhibitorias de crecimiento:

$$CI = [1 - (FCt / FCc)] \times 100$$

CI: concentración inhibitoria

FCt: factor de crecimiento de los cultivos

tratados

FCc: factor de crecimiento del cultivo

control

Cálculo de la concentración mínima inhibitoria:

$$CMI = DCf / DCi = 1$$

CMI: concentración mínima inhibitoria

Cálculo de la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento

$$CI_{50} = \frac{1}{2} FCc$$

CI₅₀: concentración inhibitoria 50%

Para la estimación de la CMI y la CI₅₀ de los diferentes experimentos, se construyeron gráficas con los factores de crecimiento en función de las diferentes concentraciones de las drogas y por extrapolación en éstas, se estimaron las concentraciones efectivas (CMI y CI₅₀).

Composición de lípidos neutros en epimastigotes de *T. cruzi* (B28V506)

Una vez establecidas las concentraciones efectivas de las drogas se analizaron los lípidos neutros de los parásitos tratados y no tratados (controles) siguiendo la metodología descrita por Bligh y Dyer (1959) para extracción de esteroides libres y esterificados.

Extracción de lípidos totales

Para la extracción de lípidos totales, se realizó el siguiente procedimiento:

Se repitieron los anteriores ensayos en volúmenes mayores de 100 ml a los tiempos establecidos para alcanzar la CI_{16} y la CI_{32} de cada droga.

Se realizaron 3 lavados con PBS pH 7,2 en centrifuga refrigerada (IEC B-22M) a 1000g durante 10 min cada una.

Se descartó el sobrenadante y se agregó una mezcla de cloroformo:metanol (2:1), agitando luego vigorosamente con el fin de extraer todos los lípidos presentes en los parásitos tratados y no tratados.

Finalmente se almacenaron en tubos de vidrio a 4 °C hasta el momento de su análisis.

Lípidos neutros

Para la separación y purificación de los esteroides libres a partir del extracto lipídico, se realizó lo siguiente:

Se realizó una filtración en embudo de vidrio con papel Wathman N° 2 de cada muestra, con el fin de separar el sólido biológico no deseado del extracto lipídico.

El material filtrado se llevó a rotaevaporación a 60°C, hasta la desecación completa.

Posteriormente se prepararon columnas para cromatografía con ácido silícico (100 mesh) activado durante 12 horas a 100°C, el cual fue resuspendido en

cloroformo (Riadel de Haen, pa) a una densidad de 5 g/ml y agregado en buretas de 100 ml hasta lograr empaquetamiento.

Las muestras añadidas a las columnas se eluyeron con 4 volúmenes de cloroformo para separar los Lipidos Neutros (LN) y se disolvieron en el menor volumen posible con cloroformo.

Los lipidos polares (LP) se eluyeron con una mezcla cloroformo –metanol (Riadel de Haen, pa) (1:1) y se disolvieron en mínimo volumen de mezcla cloroformo-metanol (1:1)

Se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso.

Purificación y caracterización de esteroides libres

Para la caracterización de los esteroides libres se resuspendieron las muestras desecadas, se concentraron y se inyectaron a un Cromatógrafo de Gas-Líquido HP5890 acoplado a un detector de masa HP5971. Se utilizó una columna capilar HP-2 Ultra con 5% de fenil-metil silicona (25 a 30m de longitud, con un diámetro interno de 0.20µm) como fase estacionaria y helio de alta pureza como gas de arrastre, a un flujo constante de 0,5 ml/min. El inyector se colocó inicialmente en posición splitless y luego en split y la temperatura fue programada a 50 °C 1 minuto, luego 280 °C con una velocidad de 25 °C/min, se aumentó a 300 °C a razón de 1 °C/min.

La identificación de los esteroides libres se realizó en los cromatogramas de acuerdo a los tiempos de retención, y a los espectros de masas correspondiente conforme a la base de datos incorporada Wiley 275 (G1035A), la cual contiene 275000 compuestos con sus espectros de masas.

Análisis ultraestructural de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado B28V506)

Para la evaluación ultraestructural de los epimastigotes de *T. cruzi* se procesaron alícuotas de los cultivos tratados y no tratados con azasteroles (AZA1 y AZA3) por el método convencional para microscopía electrónica de transmisión de células libres (MET) de la siguiente forma:

A partir de 1ml de cada uno de los cultivos tratados y no tratados, se lavaron 3 veces con buffer fosfato salino (PBS 0,1 M), pH 7.4 a intervalos de 5 min a 1000 g en una microcentrífuga (Thomas Scientific, modelo C1236V-TS).

Se resuspendió el sedimento en 1 ml de glutaraldehído al 2.5% (Electron Microscopy Sciences), pH 7.4 y se incubó a 4 °C durante 90 min esto con el fin de lograr la fijación de la muestra.

Se realizaron 3 lavados de la misma forma que en el paso 1.

El sedimento fue resuspendido en 1 ml de tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% (Electron Microscopy Sciences) y se incubó a 4 °C durante 90 min para lograr una post-fijación de la muestra.

Se lavaron 3 veces con agua desionizada y centrifugación a intervalos de 5 min a 1000 g.

Cada una de las muestras fueron incluidas en agar-agar 4% y se dejaron hasta la solidificación en moldes y luego se cortaron en cubos de 1mm^3 .

Los cubos se llevaron a deshidratación utilizando una serie de etanol (Riadel de Haen. pa) comenzando por 70%, luego 80, 90 y 95% por 10 min cada uno y culminando con 100% dos veces por 15 min cada vez.

Luego de eliminar todo el etanol cada muestra se incubó en una mezcla 1:1 de óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences) y etanol 100% y luego de óxido de propileno puro durante 20 min cada uno.

Se procedió a la infiltración colocando las muestras (cubos de agar) en una mezcla de óxido de propileno con resina epóxica (EMBE D-812, Electron Microscopy Sciences) en las proporciones de 3:1, 1:1 y 1:3 durante 30 min cada una.

Seguidamente se colocaron las muestras en resina pura y se dejaron infiltrar durante 48 h a 4 °C y luego se realizaron 3 cambios de resina pura cada 30 min.

Por último, se colocaron los bloques de agar infiltrados en los moldes de inclusión, debidamente rotulados e identificados, y se llenaron totalmente con resina epóxica pura. Se incubaron a 60 °C por 48 h para su polimerización.

Se realizaron cortes gruesos en un ultramicrotomo (Reichert Jung, Ultracut-E) y coloración con azul de toluidina al 1%, para verificar la presencia de los parásitos en los bloques de resina.

Luego se realizaron los cortes finos en el ultramicrotomo (Leica EMUC6), y contrastación con acetato de uranilo y citrato de plomo.

La observación y registro fotográfico de las muestras se realizó en un microscopio electrónico de transmisión (MET) Hitachi H600.

Determinación de la citotoxicidad de las drogas.

Para evaluar el efecto citotóxico de cada una de las drogas, se empleó una línea de células Vero (línea celular derivada del riñón del mono verde africano,

Cercopithecus aethiops), en las cuales se probó la concentración mínima inhibitoria estimada en parásitos de cada droga, a fin de evaluar la viabilidad en función del tiempo de exposición:

Se realizaron cultivos a partir de una densidad celular inicial de 5×10^5 células / ml de medio MEM (Minimum essential médium, Sigma[®]) suplementado 5% de suero fetal bovino (GIBCO-BRL).

En volúmenes no mayores a 5 ml de altura en frascos de 25 ml se incubaron los cultivos a 35 °C en atmósfera de 5% de CO₂ (Shel-Lab, modelo TC2323) hasta alcanzar el 70% de confluencia (semiconfluentes).

Por cuadruplicado se realizaron ensayos utilizando para los controles cultivos de células sanas que contenían 1% de DMSO y para las drogas 18,2 µM de AZA1 y 2,3 µM de AZA3 (concentraciones mínimas inhibitorias), las cuales fueron procesadas para evaluar los efectos a las 0, 24 y 48 horas de tratamiento. Posteriormente utilizando el microscopio de luz invertida (Nikon, modelo eclipse TS100) se determinó el estado de cada cultivo.

Luego en cámara de flujo laminar se descartó cuidadosamente el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados con PBS pH 7,2 estéril y se adicionó a cada frasco 1ml de Tripsina (Sigma[®]) y se incubó a 37 °C durante 1 minuto.

Luego los frascos de cultivo se golpearon cuidadosamente con la palma de la mano para desprender la monocapa y se adicionó 1 ml de medio MEM para detener la acción de la Tripsina

Con ayuda de una pipeta estéril se mezcló el cultivo hasta lograr una buena homogenización, de la cual se extrajeron 500 μ l y se mezclaron con igual volumen de azul tripano al 1%.

En cámara Neubauer se cuantificó la viabilidad de las células en función del tiempo de exposición a cada una de las drogas.

Análisis estadístico

Los cálculos y gráficos se realizaron utilizando el programa Microsoft Office Excel 2003.

RESULTADOS

Efecto de Benznidazol (BNZ), 20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(R)-3 β -diol (AZA1) y 22-piperidin-3-il-pregnano-22(S)-3 β -diol (AZA3) sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado B28V506).

Benznidazol, compuesto usado de forma convencional en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, indujo un efecto antiproliferativo dosis-dependiente sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado B28V506) (figura 1).

A las 120 horas de tratamiento con BZN se estimó una CMI de 29,2 μ M y la CI₅₀ en 15,7 μ M (Figura 2).

Las observaciones directas al microscopio óptico de los parásitos tratados con las concentraciones inhibitorias del crecimiento de BZN mostraron pérdida de la movilidad celular, hinchamiento, vacuolización y formación de agregados celulares, previo a la lisis celular.

Los compuestos azasteroles (AZA1) y (AZA3) indujeron un potente efecto antiproliferativo dosis-dependiente sobre epimastigotes de *T. cruzi* (aislado B28V506), (1,6 y 12,7 veces, respectivamente) mayores que la droga de tratamiento convencional (BZN) (figuras 3 y 5).

A las 120 horas las CMI estimadas para AZA1 y AZA3 fueron de 18,2 μ M y 2,3 μ M respectivamente, y la CI₅₀ se estimó en 10,6 μ M para AZA1 y en 1,45 μ M en el caso de AZA3 (figuras 4 y 6).

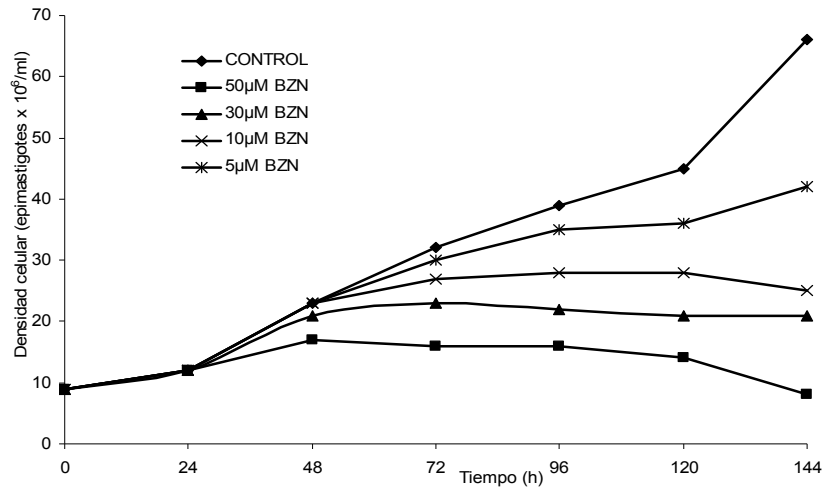


Ilustración 1. Efecto de benznidazole sobre el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado B28V506).

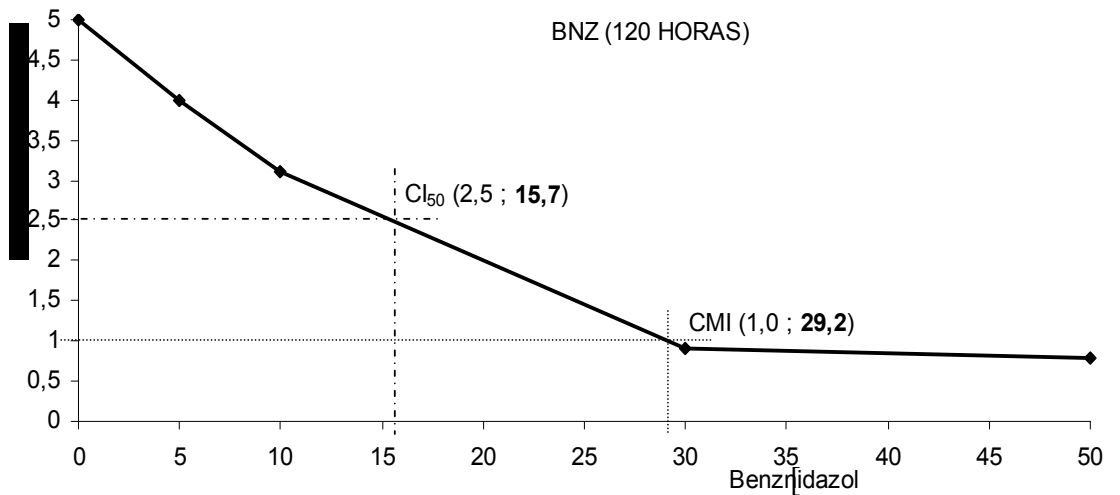


Ilustración 2. Curva dosis-respuesta para la estimación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Inhibitoria del 50% (CI₅₀) de benznidazol, a las 120 horas post-tratamiento.

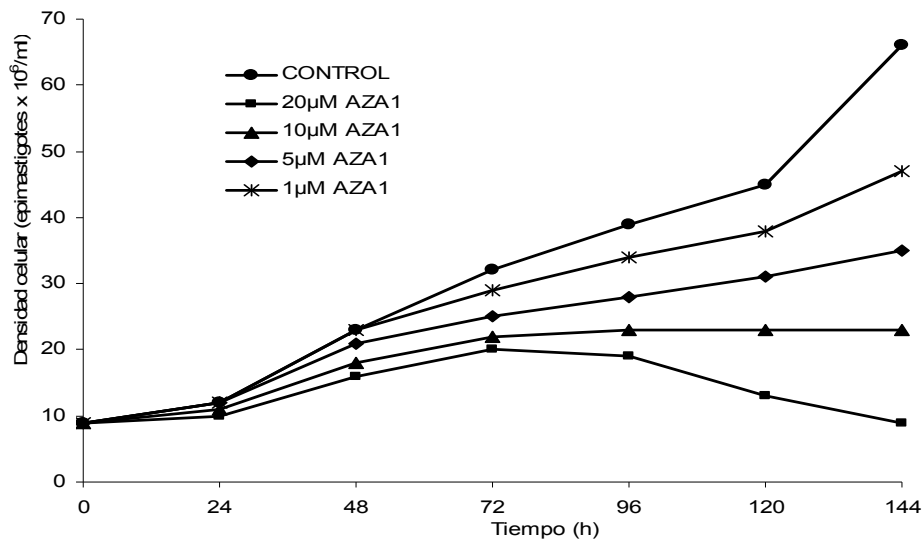


Ilustración 3. Efecto de 20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(R)-3 β -diol sobre el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado B28V506).

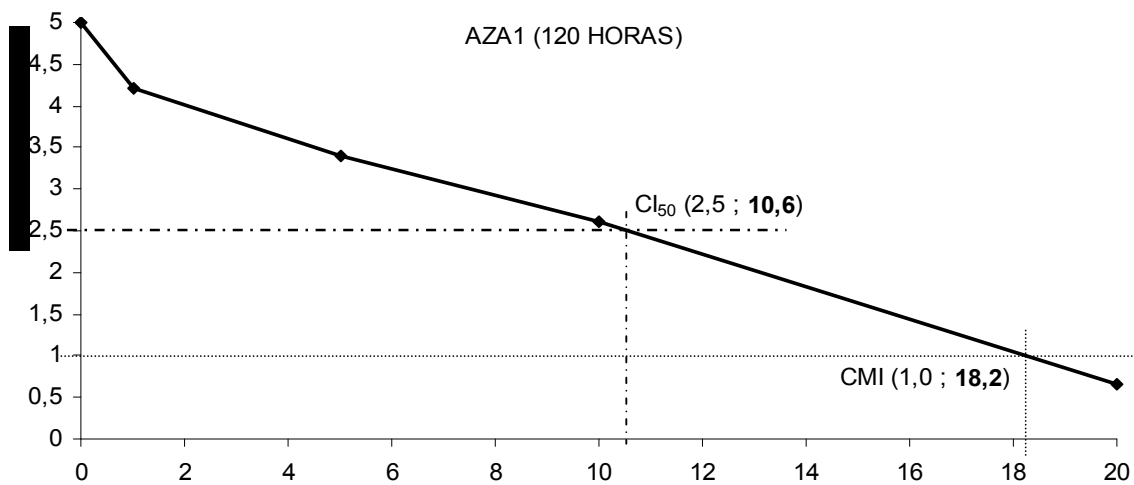


Ilustración 4. Curva dosis-respuesta para la estimación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Inhibitoria del 50% (CI50) de AZA1 a las 120 horas post-tratamiento.

[AZA1]

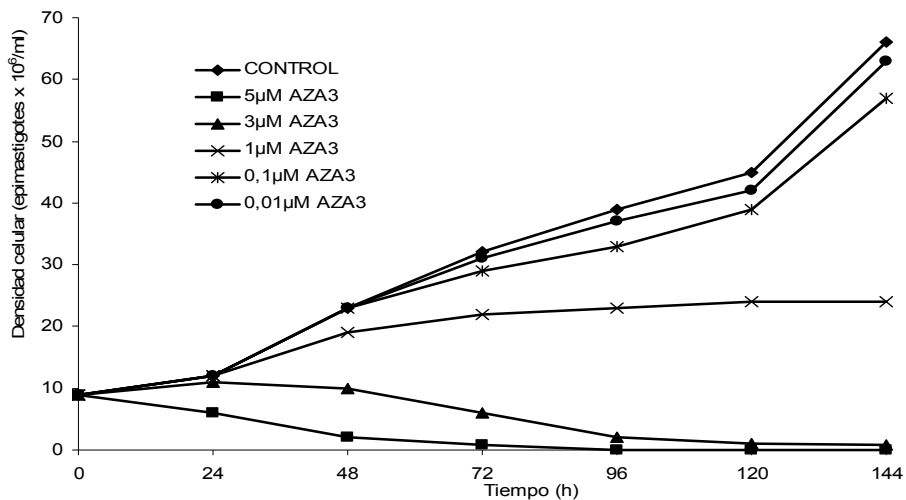


Ilustración 5. Efecto de 22-piperidin-3-il-pregnano-22(S)-3β-diol sobre el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado B28V506).

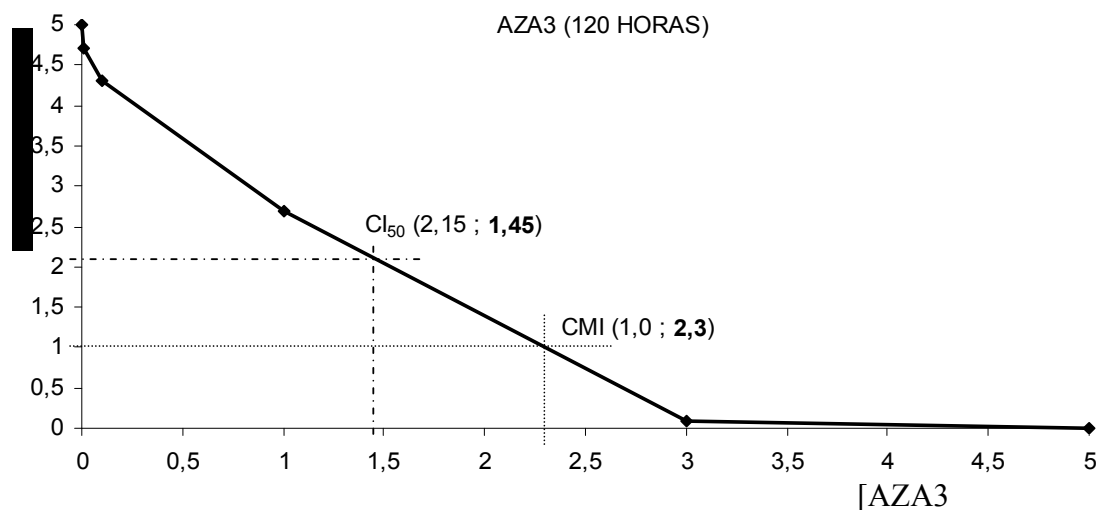


Ilustración 6. Curva dosis-respuesta para la estimación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Inhibitoria del 50% (CI50) de AZA3, a las 120 horas post-tratamiento.

Estudio de la composición de lípidos neutros en epimastigotes de *T. cruzi* (aislado B28V506) sometidos a la acción de AZA1 durante 120h.

En el estudio de la composición de esteroides libres de los epimastigotes de *T. cruzi* (aislado B28V506), mediante la técnica de cromatografía de gases con detector

de masas, se observó en los controles (cultivos de 120h, sin tratamiento) un predominio de esteroides tipo ergosta (ergosterol; dehidroergosterol; 5-dehidroepisterol; episterol; 24-etil-colesta-5,7,22, trien-3 β -ol; 24-etil-colesta-5,7-dien-3 β -ol; 24-etil-colesta-5,7,24(24')-trien-3 β -ol) que representan el 47% del total de los esteroides (Tabla 1). Se encontró en los controles un alto porcentaje de colesterol (42,2%), este constituye un esteroide exógeno que es incorporado al parásito de forma pasiva desde el medio de cultivo.

En los epimastigotes de *T. cruzi* tratados con una CI₁₆ de AZA1 en un periodo de 120h, se encontró disminución a 16,8% de sus esteroides tipo ergosta (excepto ergosterol) y acumulación de zimosterol (24%). A una concentración mayor de esta droga (CI₃₂, 120h), se encontró una desaparición total de los ergostas, con excepción de ergosterol (6,7%) cuyo porcentaje se mantuvo cercano al de los controles, aunado a una mayor acumulación de zimosterol (colesta-8,24-dien-3 β -ol , 28,7%). (Tabla 1).

Estudio de la composición de lípidos neutros en epimastigotes de *T. cruzi* (aislado B28V506) sometidos a la acción de AZA3 durante 120h.

En los epimastigotes tratados con una CI₁₆ y CI₃₂ de AZA3 por 120h, se encontró desaparición de ergosterol y los esteroides 24-etil-colesta-5,7-dien-3 β -ol; 24-etil-colesta-5,7,24(24')-trien-3 β -ol y episterol, y disminución considerable en relación al control de dehidroergosterol; 5-dehidroepisterol y 24-etil-colesta-5,7,22, trien-3 β -ol.

Adicionalmente, se observó acumulación de esteroides tipo colesta como zimosterol en un promedio de 11,5% con ambas concentraciones efectivas (CI₁₆: 11,1% y CI₃₂: 11,9%), así como colesta-5,7,24-trien-3 β -ol y colesta-7,24-dien-3 β -ol en promedios de 13% y 1%, respectivamente.

Tabla 1. Efecto de 20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(R)-3 β -diol (AZA1) y 22-piperidin-3-il-pregnano-22(S)-3 β -diol (AZA3) en la composición de lípidos neutros (% de masa) de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado B28V506). Periodo de exposición de 120h.

COMPUESTO	Tr	CONTROL (CI ₁₆)	AZA1 (CI ₃₂)	AZA1 (CI ₁₆)	AZA3 (CI ₁₆)	AZA3(CI ₃₂)
EXÓGENOS						
Colesterol	21,98	42,2	56,3	61,6	55,4	48,2
ENDÓGENOS						
Escualeno	16,28	11,0	1,7	0	0	6,4
Zimosterol (colesta- 8,24-dien-3 β -ol)	23,11	0	24,0	28,7	11,1	11,9
Colesta-5,7,24-trien- 3 β -ol	23,46	0	-----	-----	12,7	14,2
Ergosterol (ergosta- 5,7,22-trien-3 β -ol)	23,48	6,8	6,3	6,7	0	0
Colesta-7,24-dien-3 β - ol	23,75	0	0,8	0	1,4	0,9
Ergosta-5,7,22,24(24')- tetraen-3 β -ol	24,14	0	-----	-----	4,1	5,8
Ergosta-8,24(24')- dien-3 β -ol	24,38	0	4,1	2,9	1,3	1,0
Ergosta-5,7-dien-3 β - ol(Dehidroergosterol)+Ergosta- 5,7,24(24')-trien-3 β -ol (5-Dehidroepisterol)	24,90	18,0	1,5	0	10,0	7,4
Ergosta-7,24(24')- dien-3 β -ol (Episterol)	25,12	2,1	0	0	0	0
24-etil-colesta- 5,7,22,24-trien-3 β -ol	25,64	6,8	4,9	0	3,0	3,4
Lanosterol	26,53	0	0,5	0	1,0	0,8
24-etil-colesta-5,7- dien-3 β -ol	27,10	11,9	0	0	0	0
24-etil-colesta- 5,7,24(24')-tetraen-3 β -ol	27,49	1,2	0	0	0	0

Tr: Tiempo de retención (min).

Estudio ultraestructural de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado B28V506) sometidos a la acción de AZA1 por 120h de tratamiento:

Los epimastigotes de *T. cruzi* no tratados (cultivos controles) mostraron uniformidad e integridad de la membrana plasmática, electrón-densidad regular del citoplasma y mitocondria (figura 7).

En el caso de los epimastigotes tratados con una CI_{32} de AZA1 (figura 8) se encontró pérdida de la electrón-densidad del citoplasma (figura 8a) y pérdida de la integridad de la membrana plasmática con evaginaciones (figura 8b).

Estudio ultraestructural de epimastigotes de *T. cruzi* (aislado B28V506) sometidos a la acción de AZA3 por 120h de tratamiento:

La figura 9, muestra el efecto inducido con un CI_{16} de AZA3 sobre epimastigotes de *T. cruzi*, observándose vacuolización (figura 9a-b), hinchamiento y pérdida de la integridad mitocondrial (figura 9b).

En el caso de los epimastigotes tratados con el doble de la concentración de AZA3 (CI_{32}) se acentúan más los daños antes mencionados (figura 10) aunado a aparición de evaginaciones en la membrana plasmática (11b).

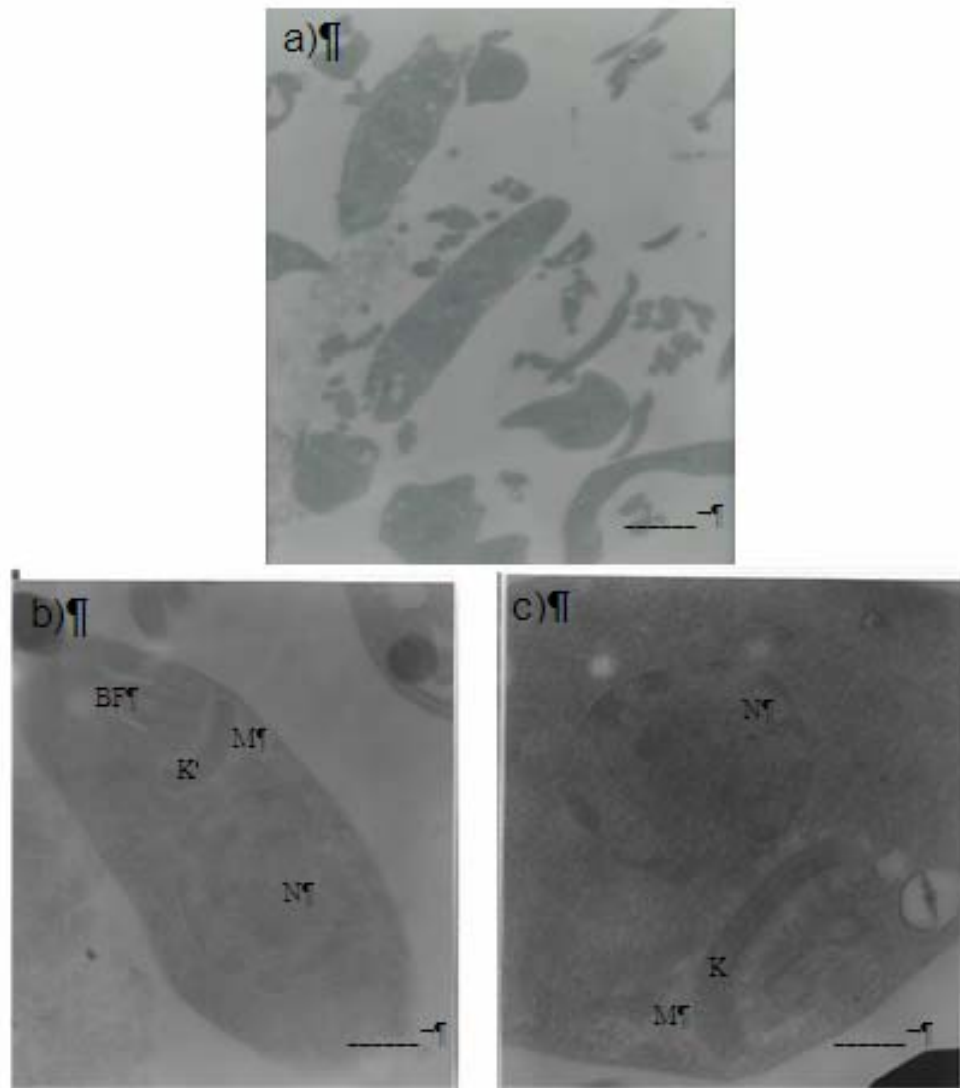


Ilustración 7. Ultraestructura de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado B28V506) sin tratamiento. N: núcleo; K: kinetoplasto; M: mitocondria; BF: bolsa flagelar.

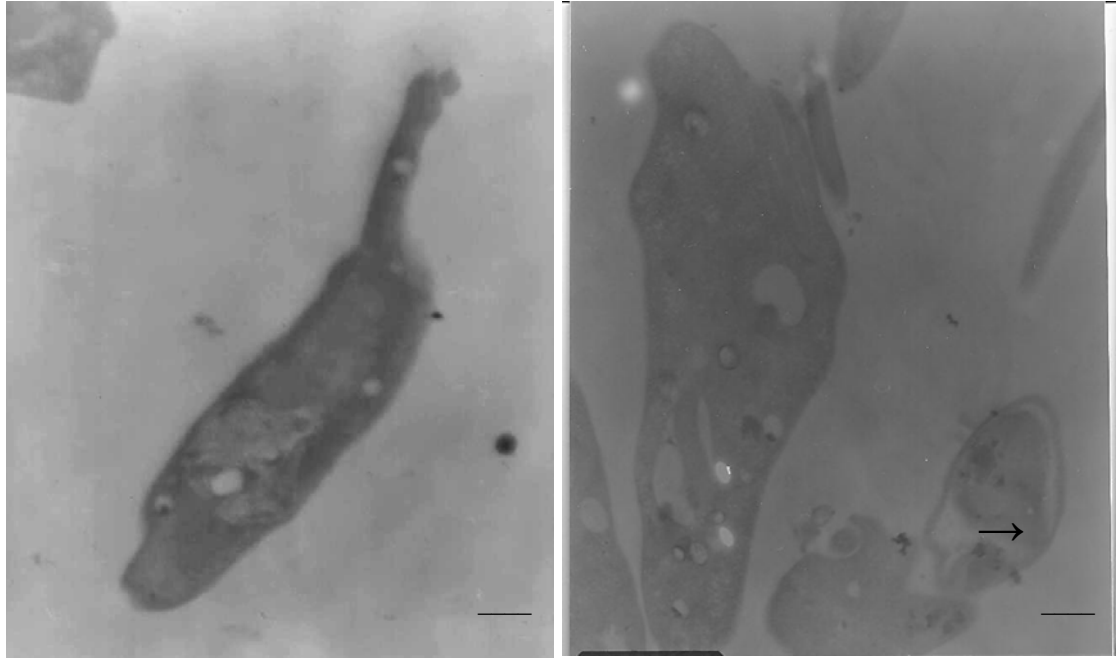


Ilustración 8. Ultraestructura de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado B28V506) con CI32 de AZA1 durante 120h. N: núcleo. →: evaginación.

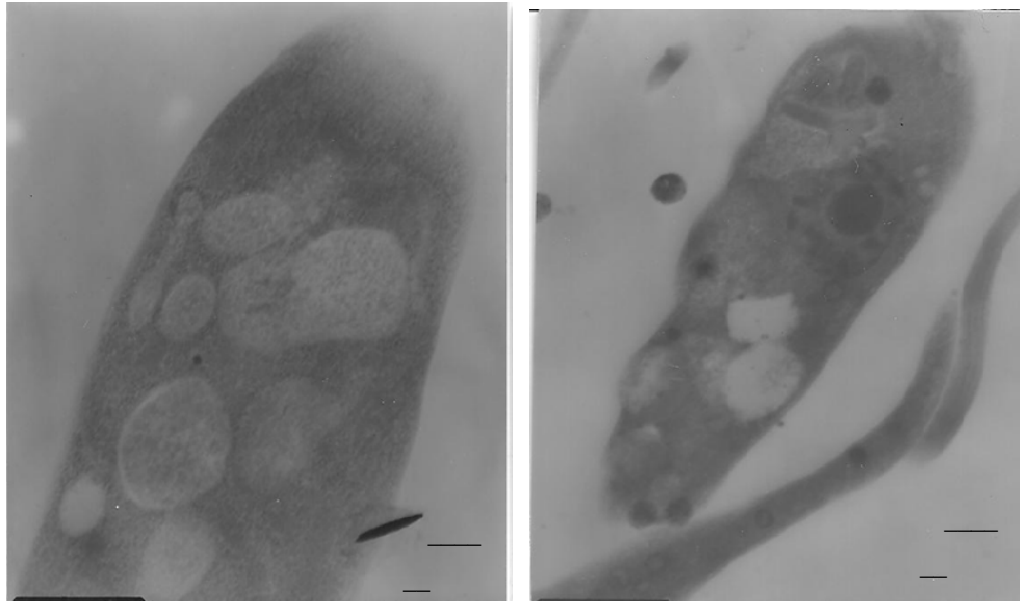


Ilustración 9. Ultraestructura de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado B28V506) tratadas con CI16 de AZA3 durante 120h. V: vacuolas. M: mitocondria.

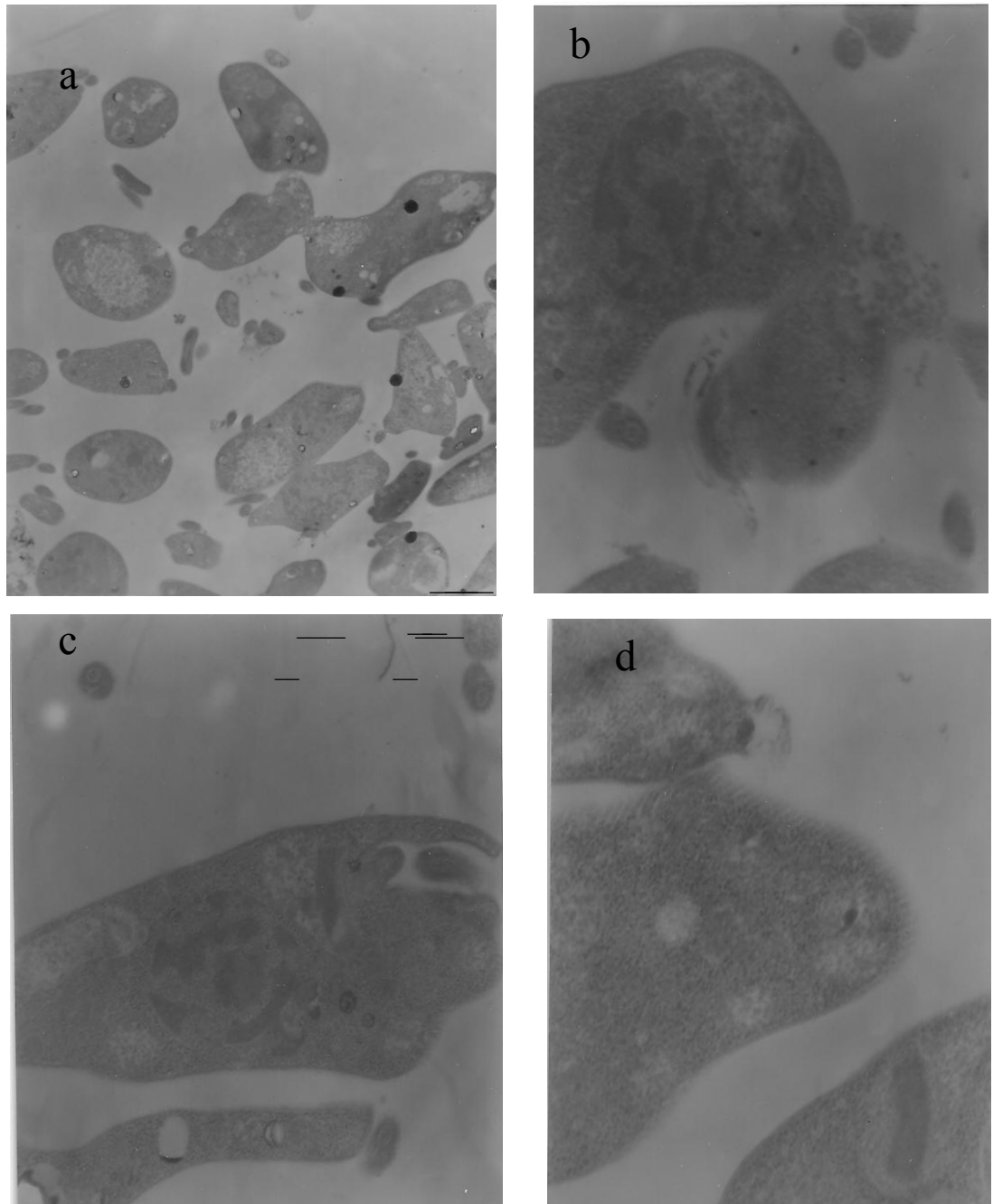


Ilustración 10. Ultraestructura de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado B28V506) tratados con CI32 AZA3 durante 120h. M: mitocondria.

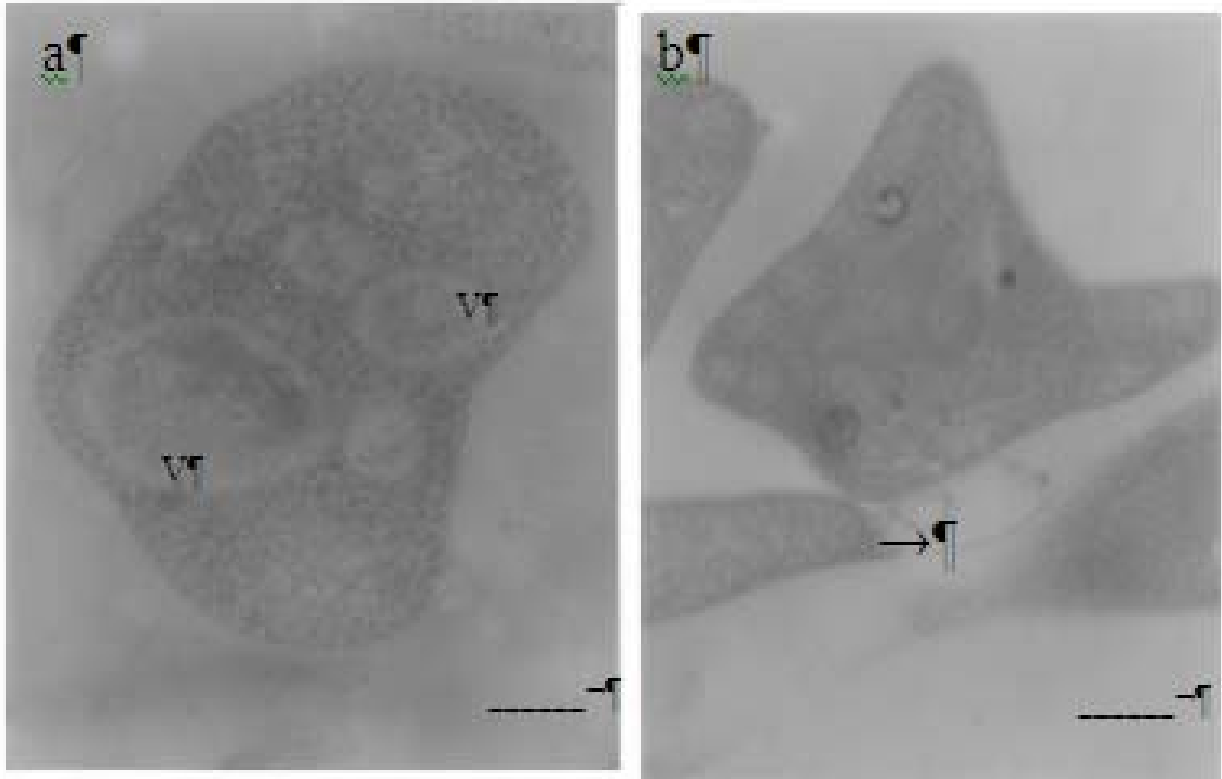


Ilustración 11. Ultraestructura de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado B28V506) tratados con CI32 de AZA3 durante 120h. V: vacuola. →: evaginación

Estudio de la citotoxicidad de AZA1 y AZA3 sobre células Vero

Se encontró con 18,2 μ M (CMI en parásitos) de AZA1 un leve porcentaje (5%) de células afectadas (no viables) en las primeras 24 horas de exposición, con respecto a los controles, y un progresivo aumento de células afectadas (11%) a las 48 horas. Con 2,3 μ M de AZA3 (CMI en parásitos) el porcentaje de células afectadas fue de 13% en las primeras 24 h y 30% a las 48 h (Figura 12).

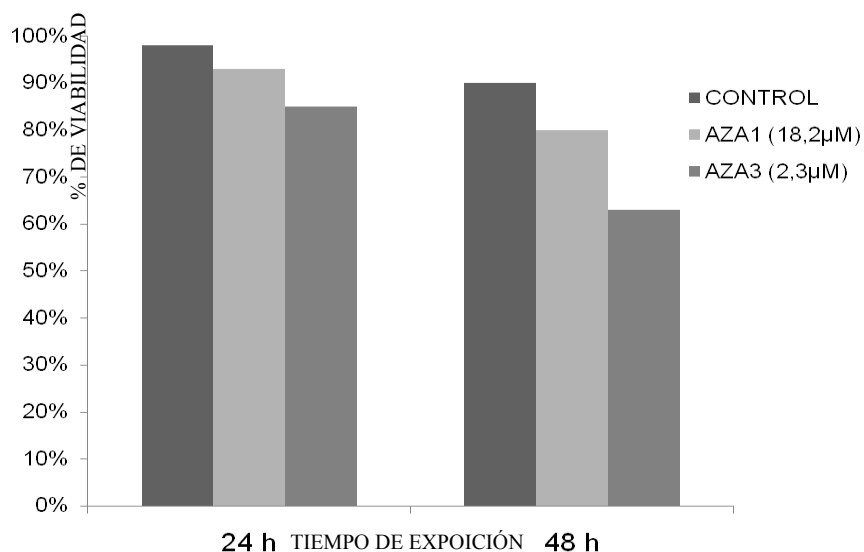


Ilustración 12. Efecto de 18 μ M (CMI) de 20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(r)-3 β -diol y 2,3 μ M (CMI) de 22-piperidin-3-il-pregnano-22(S)-3 β -diol en células Vero durante 48 h.

DISCUSIÓN

La síntesis de esteroides es una de las rutas metabólicas más complejas presentes en células eucariotas, que involucra al menos 20 pasos importantes catalizados por enzimas específicas (Anexo 4). Estos esteroides son sintetizados a partir de acetil-coenzima A (acetil CoA), en un proceso común hasta la síntesis de epóxido de escualeno, a partir del cual la ruta se ramifica para producir la conversión de lanosterol a colesterol o a ergosterol, destacando que en esta etapa hay grandes diferencias entre la ruta de biosíntesis de esteroides de mamíferos y eucariotes inferiores (Basson *et al.*, 1986; Chappell *et al.*, 1995; Bach *et al.*, 1999).

Considerando estos aspectos, toma vigencia e importancia la quimioterapia racional, que se fundamenta en que conocidas las bases bioquímicas y moleculares de los agentes causales de enfermedades, es posible establecer diferencias claves entre estos y sus hospederos, y determinar blancos específicos de acción de drogas que dañen al parásito sin afectar el hospedero.

En este sentido se planteó en este trabajo evaluar el efecto *in vitro* de 20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(r)-3 β -diol (AZA1) y 22-piperidin-3-il-pregnano-22(S), 3 β -diol (AZA3). Estos compuestos constituyen un grupo novedoso de análogos de esteroides que poseen un heteroátomo en la cadena lateral, nitrógeno; que podrían actuar como posibles inhibidores de la $\Delta^{24(25)}$ -esterol metiltransferasa (24-EMT), enzima que utiliza zimosterol como sustrato y en pasos sucesivos da origen a la síntesis de esteroides esenciales tipo ergosta especie-específicos, característicos de tripanosomatídeos.

Transcurridas 120 horas de tratamiento con BNZ (medicamento convencional en la enfermedad de Chagas) se encontró una inhibición de 20% (CI_{20}) del crecimiento de los cultivos a una concentración de $5\mu\text{M}$ y una dosis letal del 56% (DL_{56}) a una concentración de $50\mu\text{M}$. Faundez *et al.* (2005) en un estudio realizado en epimastigotes de *T. cruzi* reportan una DL_{50} para BZN a la concentración de $44\mu\text{M}$, lo que es similar a nuestros resultados.

Se estimaron además las concentraciones mínimas inhibitorias para cada droga por extrapolación en las curvas dosis-respuesta, encontrando que AZA3 es 7,9 veces más potente que AZA1 y 12,7 veces más que BZN.

Estos resultados evidencian una mayor potencia letal de los azasteroles con respecto al tratamiento convencional con Benznidazole, principalmente AZA3, lo que podría representar en el futuro un potencial tratamiento contra *T. cruzi*.

Urbina *et al.* (1995) en un estudio realizado en epimastigotes de *T. cruzi* cultivados en medio LIT, probaron concentraciones de AZA1 entre $1\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$ y consiguieron efectos antiproliferativos similares a los reportados en este trabajo.

Rodrigues *et al.* (2001), estudiaron el efecto antiproliferativo de AZA1 en *T. cruzi* reportando una CMI para la forma epimastigote de $10\mu\text{M}$, valor similar al demostrado en este estudio; asimismo, estos investigadores reportaron una CMI para la forma amastigote de $0,1\mu\text{M}$, lo que demuestra una mayor susceptibilidad del parásito en esta forma.

Por otra parte, Rodrigues *et al.* (2002) reportan una CI_{50} para AZA1 de $1\mu\text{M}$ sobre promastigotes de *Leishmania amazonensis* luego de 24h de tratamiento y para la forma amastigote de $0,1\mu\text{M}$ a 120h de tratamiento.

Visbal *et al.* (2003) realizaron un estudio en *Paracoccidioides brasiliensis*, un hongo dimórfico patógeno; utilizando AZA1, AZA2 y AZA3, encontrando también una mayor actividad de este último (CMI: 0,5 μ M) con respecto a AZA1 (5 μ M) y AZA2 (10 μ M), respectivamente. Estos resultados, a pesar de no ser en parásitos guardan gran relación con este trabajo en lo referente a la actividad más potente de AZA3 con respecto a AZA1, y es consistente con la existencia de la misma ruta de biosíntesis post-lanosterol en eucariotes inferiores.

Urbina *et al.* (2000) realizaron un estudio utilizando derivados triazólicos (capaces de inhibir la biosíntesis de esteroides post-lanosterol) y encontraron un efecto antiproliferativo dosis-dependiente de estos inhibidores sobre epimastigotes de *T. cruzi* en el mismo rango de concentraciones.

Recientemente, Simoni (2007) en un estudio realizado sobre promastigotes de *Leishmania (V) braziliensis*, demostró un efecto antiproliferativo dosis-dependiente utilizando un inhibidor de la biosíntesis de esteroides (22-hidrazona-imidazolin-2-il-5-colesta-3 β -ol) y reportó una CMI a las 48 horas de 3,7 μ M y una DL₁₀₀ con 4 μ M en tan solo 12 horas de tratamiento.

Se realizó por cromatografía de gases y espectrometría de masa, un análisis de los esteroides libres presentes en epimastigotes de *T. cruzi*, sin tratamiento alguno (controles), y se consiguió como principales esteroides endógenos a dehidroergosterol y 5-dehidropisterol, que co-eluyen al mismo tiempo de retención (18,0 %); seguidos de 24-etil-colesta-5,7-dien-3 β -ol (11,9 %); ergosterol (6,8 %); 24-etil-colesta-5,7,22, trien-3 β -ol; Episterol (2,1 %) y 24-etil-colesta-5,7,24(24')-trien-3 β -ol (1,2 %), Tabla 1.

La composición de esteroides libres indica que la suma total de todos los esteroides endógenos de tipo ergosta (metilados en el C-24 de la cadena lateral)

representan el 46,8%, lo que constituye una mayor proporción de los esteroides esenciales por encima del colesterol con 42,2%, el cual es un esteroide exógeno incorporado de forma pasiva por el parásito desde el medio de cultivo. Este perfil de esteroides es semejante al reportado por Rodrigues *et al.* (2001) en *T. cruzi* (cepa Y) en medio de infusión cerebro-corazón (IBH).

Cuando los epimastigotes de *T. cruzi* fueron tratados con AZA1 cambió la relación entre esteroides tipo colestano y ergostano, determinada principalmente por el aumento de zimosterol, el cual se acumuló en un 24% cuando los parásitos fueron sometidos apenas a una CI_{16} del compuesto. Se demostró disminución de los principales esteroides tipo ergostano con excepción del ergosterol, el cual se mantiene cercano a sus niveles normales (controles). Estos resultados podrían sugerir la participación de AZA1 como inhibidor de la ruta de biosíntesis de esteroides a nivel de la enzima $\Delta^{(24,25)}$ esterol metiltransferasa (24-EMT) que cataliza la metilación de zimosterol en el C-24 dando origen a ergostano-8,24(24')-dien-3 β -ol, con su concomitante acumulación, como se postula en la ruta de biosíntesis propuesta por Urbina *et al.* (1995) (anexo 7).

Es importante resaltar que a pesar de la inhibición 24-EMT, descrita anteriormente, los niveles de ergosterol se mantienen, no así los de dehidroergosterol /5-dehidroepisterol y 24-etil-colestano-5,7-dien-3 β -ol, lo que sugiere algún mecanismo no descrito aún, que permite la síntesis de este esteroide esencial a partir de otro precursor no convencional, por lo que el parásito logra mantener su viabilidad. Un posible mecanismo podría ser la síntesis de análogos estructurales a los precursores del ergosterol, a partir de ergostano-8,24(24')-dien-3 β -ol, el cual no aparece en los controles y se acumula en el tratamiento con una CI_{16} de AZA1.

Benaim *et al.* (2006) en un estudio realizado con drogas de diferentes blancos de acción en *T. cruzi*, indican la acción de AZA1 sobre diferentes enzimas esenciales

en la síntesis de esteroides, destacando también una acumulación de zimosterol por posible bloqueo de la 24-EMT en la biosíntesis de ergosterol discutido anteriormente.

En el caso de la composición de esteroides en parásitos sometidos a AZA3 (tabla 1), esta muestra al igual que en las pruebas con AZA1 con apenas CI₁₆ una drástica disminución de los esteroides principales del tipo ergosta (suma 15,4 % con desaparición de ergosterol), con un incremento de las proporciones de esteroides tipo colestano (suma 32% , colestano-5,7,24-trien-3β-ol; colestano-7,24-dien-3β-ol y 24-etil-colestano-5,7,22-trien-3β-ol). Similar a AZA1 hubo una considerable pero importante acumulación de zimosterol de 11 %, que no se observa en parásitos no tratados.

Estos resultados sugieren un bloqueo de la síntesis de ergosterol al mismo nivel que AZA1 (24-EMT), debido a la acumulación de zimosterol; sin embargo, es importante destacar que AZA3 permite las sucesivas transformaciones de los núcleos esteroidales que generan los dobles enlaces en los carbonos C-5 y C-7, y por lo tanto, la acumulación de esteroides de tipo colestano, que a su vez impiden la formación de precursores esteroides de tipo ergosta.

Adicionalmente, estos resultados nos permiten proponer que AZA3 también podría estar inhibiendo la enzima $\Delta^{(24,25)}$ esterol-metilreductasa (24-EMR), debido a la acumulación en pequeñas proporciones de ergosta-5,7,22,24(24')-tetraen-3β-ol (4,1 %), que específicamente impide la reducción del doble enlace entre los carbonos C-24 y C-24' de la cadena lateral de los esteroides (ver ruta postulada por Urbina *et al.*, 1995, Anexo 7).

Urbina *et al.* (1995) en un estudio realizado en parásitos kinetoplastidos, demostraron inhibición de la enzima $\Delta^{24(25)}$ -esterol metiltransferasa (24-EMT) por AZA1, asociado con desaparición de esteroides esenciales y acumulación de

cantidades anormales de precursores de esteroides, con consecuencias citostáticas o citotóxicas. Demostraron además actividad inhibitoria de AZA1 sobre las enzimas 24,25-(R,S)-epiminolanosterol y la 24-esterol metil reductasa (EMR), enzimas claves en la ruta de biosíntesis de ergosterol, con arresto del crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Los esteroides juegan un papel importante en la regulación de la estabilidad y fluidez de las membranas biológicas, las cuales están constituidas principalmente por una bicapa de fosfolípidos en la que también se encuentran las proteínas de membrana. Entre las funciones principales de las membranas biológicas está la permeabilidad selectiva, que permite que algunas moléculas difundan libremente a través de ella y otras sean altamente reguladas. Ésta y todas las funciones dependen primordialmente de la estructura química y arreglo de los componentes en la membrana, de tal manera que un cambio en la composición podría acarrear pérdida de su integridad y funcionalidad, pudiendo conducir a la muerte celular (Gennis, 1989).

La anterior afirmación sugiere que AZA3 podría estar siendo más potente que AZA1, quizás por la extensión de un carbono en la cadena lateral y la posición del –NH en el anillo ciclohexano (Anexo 5), de tal forma que provoca en el parásito desaparición o disminución de sus esteroides esenciales y rearrreglos membranales con análogos inapropiados, afectando la permeabilidad selectiva y por consiguiente pérdida de la viabilidad celular.

Los cambios en la composición de esteroides en las membranas inducidos por AZA1 y AZA3 son soportados por las alteraciones ultraestructurales de los epimastigotes, caracterizadas fundamentalmente por vacuolización, pérdida de la integridad mitocondrial y evaginaciones en la membrana plasmática.

Rodrigues *et al.* (2002), en un estudio realizado en promastigotes y amastigotes de *Leishmania amazonensis* utilizando AZA1, observaron alteraciones ultraestructurales a nivel de membranas, comparables a los resultados encontrados en el presente trabajo.

Arrieche *et al.* (2003) y Marchan *et al.* (2003-2004) reportaron alteraciones ultraestructurales en promastigotes de *L. (L.) mexicana* tratados con 22-hidrazona-imidazolin-2-il-5-colesta-3 β -ol y 20-hidrazona-imidazolin-2-il-5-colesta-3 β -ol (inhibidores de la 24-EMT). Encontraron con el mismo rango de concentraciones efectivas alteraciones ultraestructurales similares a este aislado de *T. cruzi.*, caracterizadas principalmente por pérdida de la integridad de la membrana plasmática y la mitocondrial.

Otros estudios realizados en *T. cruzi.*, utilizando inhibidores de la biosíntesis de esteroides diferentes, en este caso bifosfonato risedronato (Ris), un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintetasa, que cataliza la formación de poli-isoprenoides, precursor de esteroides, reportan variaciones ultraestructurales importantes tales como vacuolización progresiva del citoplasma, pérdida de la integridad de las membranas mitocondrial y nuclear, desorganización de otros organelos como reservosomas y el kinetoplasto, vesículas autofágicas principalmente, destacando la analogía con las alteraciones descritas anteriormente. Además, los cambios ultraestructurales también estuvieron relacionados con la reducción dosis dependiente de los esteroides endógenos predominantes en esta especie (ergosterol, 24-etil-colesta-5,7,44-trien-3 β -ol y sus metabolitos intermedios) (Garzoni *et al.*, 2004).

Con respecto a la citotoxicidad de los compuestos 20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(R)- 3 β -diol y 22-piperidin-3-il-pregnano-22(S)-3 β -diol se realizaron ensayos *in vitro* en una línea de células Vero, utilizando las concentraciones mínimas inhibitorias de cada droga, demostrando a las 48 h una baja citotoxicidad con ambas,

respaldando la premisa de la inexistencia de la ruta de biosíntesis de esteroides tipo ergosta post-lanosterol, que es exclusiva de eucariotes inferiores.

Urbina *et al.* (2002) utilizando un inhibidor sintético de la escualeno sintetasa en *T. cruzi* y *L. (L.) mexicana*, 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxiquinuclidina (BPQ-OH), encontraron una fuerte inhibición del crecimiento y lisis celular en estos parásitos, acompañado con bloqueo en la síntesis de sus esteroides esenciales, sin efectos tóxicos sobre la célula hospedera (células Vero).

En síntesis, estos hallazgos sugieren que la potente actividad tripanocida (12,7 veces AZA3 y 1,6 veces AZA1 mayores que la droga de tratamiento convencional BZN), podría estar asociada con la inhibición de la actividad de la enzima 24-EMT, específica de estos eucariotes inferiores, lo cual es soportado por su baja citotoxicidad en células Vero, constituyendo así una herramienta prometedora en la búsqueda de nuevas drogas que permita resolver el grave problema de salud pública que representa la enfermedad de Chagas en América Latina.

CONCLUSIONES

.- 20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(R)- 3 β -diol (AZA1) y 22-piperidin-3-il-pregnano 22(S)-3 β -diol (AZA3) mostraron una potente actividad tripanocida, 1,6 y 12,7 veces superior al tratamiento convencional con Benznidazol.

.- AZA1 Y AZA3 en epimastigotes de *T. cruzi* (aislado B28V506) inducen acumulación de zimosterol acompañada de desaparición o disminución considerable de los esteroides esenciales tipo ergosta, sugiriendo un posible bloqueo de la enzima 24-EMT, presente sólo en eucariotes inferiores.

.- AZA1 y AZA3 inducen alteraciones ultraestructurales en las membranas plasmática y mitocondriales, consistentes con los cambios en la composición de esteroides esenciales.

.- La baja citotoxicidad de AZA1 y AZA3 en células Vero constituye un hallazgo prometedor en la búsqueda de nuevas drogas para combatir el grave problema de salud pública que representa la enfermedad de Chagas en América Latina.

RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de 20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(R)-3 β -diol (AZA1) y 22-piperidin-3-il-pregnano-22(S)-3 β -diol (AZA3) en un aislado del estado Sucre y establecer comparaciones con el aislado de Portuguesa.
- Evaluar el efecto antiproliferativo de AZA1 y AZA3 en cultivos de amastigotes de *T. cruzi* en células Vero.
- Evaluar posibles combinaciones sinérgicas entre AZA1 y AZA3, y otros compuestos que inhiban la misma ruta biosintética de esteroides esenciales, a fin de garantizar un amplio rango de seguridad terapéutica en modelos experimentales de la enfermedad de Chagas.

BIBLIOGRAFÍA

Andrade, S.; Rassi, A.; Magalhães, J.; Ferrioli, F. y Luquetti, A., 1992. Specific chemotherapy of Chagas' disease: a comparison between the response in patients and experimental animals infected with the same strains. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 86:624-626.

Añez, N.; Carrasco, H.; Parada, H.; Crisante, G.; Rojas, A.; Fuenmayor, C.; González, N.; Percoco, G.; Borges, R.; Guevara, P. y Ramírez, J. 1999. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60:726-732.

Arrieche, D.; Marchán, E.; Simoni, Z.; Luna, R.; Alvarez A. y Visbal, G. 2003. Antiproliferative effect *in vitro* of 22-hidrazone-imidazoline-2-yl-5-colen-3 β -ol on *Leishmania (L.) mexicana* promastigotes. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 45(13): 53-54.

Atencio, R.; Visbal, G.; Pekerar, S.; Papale, J. y Urbina, J. 2001. Studies of molecular structure parameters of 20-piperidin-2-yl-5 α -pregnan-3 β ,20-diol and its N-methyl derivative: two effective inhibitors of $\Delta^{24, 25}$ sterol methyl transferase on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Act. Cryst.*, 57:714-721.

Bach, T.; Boronat, A.; Campos, N. y Ferrer, V. 1999. Mevalonate biosynthesis in plant. *Crit. Rev. Bioch. Mol. Biol.*, 34:107-122.

Bahia, L.; Gomes, J.; Cançado, J.; Ferrari, T.; Lemos, E.; Luz, Z.; Moreira, M.; Gazzinelli, G. y Correa, R. 2000. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J. Inf. Dis.* 182:634-638.

Basson, M.; Thorsness, M. y Rine, J. 1986. *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.*, 83:5567.

Benaim, G.; Sanders, J.; Garcia, Y.; Colina, C.; Lira, R.; Caldera, A.; Payares, G.; Sanoja, C.; Burgos, J.; Leon, A.; Concepción, J.; Schijman, A.; Levin, M.; Oldfield, E. y Urbina J. 2006. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med. Chem.*, 49 (3): 892-899.

Berriman, M.; Ghedin, E.; Hertz-Fowler, C.; Blandin, G.; Renault, H.; Bartholomeu, D.; Lennard, N.; Caler, E.; Hamlin, N.; Haas, B.; Bohme, U.; Hannick, L.; Aslett, M.; Shallom, J.; Marcello, L.; Hou, L.; Wickstead, B.; Alsmark, U.;

Arrowsmith, C.; Atkin, R.; Barron, A.; Bringaud, F.; Brooks, K.; Carrington, M.; Cherevach, I.; Chillingworth, T.; Churcher, C.; Clark, L.; Corton, C.; Cronin, A.; Davies, R.; Doggett, J.; Djikeng, A.; Feldblyum, T.; Field, M.; Fraser, A.; Goodhead, I.; Hance, Z.; Harper, D.; Harris, B.; Hauser, H.; Hostetler, J.; Ivens, A.; Jagels, K.; Johnson, D.; Johnson, J.; Jones, K.; Kerhornou, A.; Koo, H.; Larke, N.; Landfear, S.; Larkin, C.; Leech, V.; Line, A.; Lord, A.; Macleod, A.; Mooney, P.; Moule, S.; Martin, D.; Morgan, G.; Mungall, K.; Norbertczak, H.; Ormond, D.; Pai, G.; Peacock, C.; Peterson, J.; Quail, M.; Rabbinowitsch, E.; Rajandream, M.; Reitter, C.; Salzberg, S.; Sanders, M.; Schobel, S.; Sharp, S.; Simmonds, M.; Simpson, A.; Tallon, L.; Turner, C.; Tait, A.; Tivey, A.; Van Aken, S.; Walker, D.; Wanless, D.; Wang, S.; White, B.; White, O.; Whitehead, S.; Woodward, J.; Wortman, J.; Adams, M.; Embley, T.; Gull, K.; Ullu, E.; Barry, J.; Fairlamb, A.; Opperdoes, F.; Barrell, B.; Donelson, J.; Hall, N.; Fraser, C.; Melville, S. y El-Sayed, N. 2005. The genome of the african trypanosome. *Trypanosoma brucei*. *Science.*, 309:416-422.

Bligh, E. y Dyer, W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Bioch. Phys.*, 37:910-917.

Brener, Z. y Gazzinelli, R. 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Aller. Imm.*, 114:103-110.

Cançado, J. 1999. Criteria of Chagas disease cure. *Mem. Inst. Osw. Cr.*, 94(1):331-336.

Coura, J. y Castro, S. 2002. A critical review on Chagas Disease chemotherapy. *Mem. Inst. Osw. Cr.*, 97:3-24.

Coura JR (2007) Chagas disease: what is known and what is needed- A background article. *Mem. Inst. Osw. Cr.* 102 (1): 113-122.

Chappell, J.; Wolf, F.; Proulx, J.; Cuellar, R. y Saunders, C. 1995. Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plant? *Plant. Physiol.*, 109:1337-1343.

Chiari, E. y Camargo, E. Culturing and cloning of *T. cruzi*. 1(3):23-26. En: *Genes and antigens of parasites*. Morel, C. M. 2a. Ed. Rio de Janeiro: Fun. Osw. Cr, 1984.

Cunha-Neto, E.; Duranti, M.; Gruber, A.; Zingales, B.; De Messias, I.; Stolf, N.; Bellotti, G.; Patarroyo, M. y Kalil, J. 1995. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: Biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:3541-3545.

Docampo, R. 1990. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem. Biol. Inter.*, 73:1-27.

El-Sayed, N.; Myler, P.; Bartholomeu, D.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A.; Ghedin, E.; Worthey, E.; Delcher, A.; Blandin, G.; Westenberger, S.; Caler, E.; Cerqueira, G.; Branche, C.; Haas, B.; Anupama, A.; Arner, E.; Aslund, L.; Attipoe, P.; Bontempi, E.; Bringaud, F.; Burton, P.; Cadag, E.; Campbell, D.; Carrington, M.; Crabtree, J.; Darban, H.; da Silveira, J.; de Jong, P.; Edwards, K.; Englund, P.; Fazalina, G.; Feldblyum, T.; Ferella, M.; Frasch, A.; Gull, K.; Horn, D.; Hou, L.; Huang, Y.; Kindlund, E.; Klingbeil, M.; Kluge, S.; Koo, H.; Lacerda, D.; Levin, M.; Lorenzi, H.; Louie, T.; Machado, C.; McCulloch, R.; McKenna, A.; Mizuno, Y.; Mottram, J.; Nelson, S.; Ochaya, S.; Osoegawa, K.; Pai, G.; Parsons, M.; Pentony, M.; Pettersson, U.; Pop, M.; Ramirez, J.; Rinta, J.; Robertson, L.; Salzberg, S.; Sanchez, D.; Seyler, A.; Sharma, R.; Shetty, J.; Simpson, A.; Sisk, E.; Tammi, M.; Tarleton, R.; Teixeira, S.; Van Aken, S.; Vogt, C.; Ward, P.; Wickstead, B.; Wortman, J.; White, O.; Fraser, C.; Stuart, K., Andersson, B., 2005a. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science.*, 309(5733):409-415.

El-Sayed, N.; Myler, P.; Blandin, G.; Berriman, M.; Crabtree, J.; Aggarwal, G.; Caler, E.; Renauld, H.; Worthey, E.; Hertz-Fowler, C.; Ghedin, E.; Peacock, C.; Bartholomeu, D.; Haas, B.; Tran, A.; Wortman, J.; Alsmark, U.; Angiuoli, S.; Anupama, A.; Badger, J.; Bringaud, F.; Cadag, E.; Carlton, J.; Cerqueira, G.; Creasy, T.; Delcher, A.; Djikeng, A.; Embley, T.; Hauser, C.; Ivens, A.; Kummerfeld, S.; Pereira-Leal, J.; Nilsson, D.; Peterson, J.; Salzberg, S.; Shallom, J.; Silva, J.; Sundaram, J.; Westenberger, S.; White, O.; Melville, S.; Donelson, J.; Andersson, B.; Stuart, K. y Hall, N.; 2005b. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science.*, 309(5733):404-409.

Engman, D. y León, J. 2002. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Act. Trop.*, 81:123-132.

Faundez M., Pino L., Letelier P., Ortiz C., López R., Seguel C., Ferreira J., Pavani M., Morello A., Maya J.D. 2005. Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agen. Chem.*, 49:126–130.

Figuera, L.; Herrera, L.; Carrasco, H.; Martínez, C.; Zambrano, E.; Espinoza, R. y Marchan, E. 2006. Chagas disease epidemiological study at “El Maco”, Sucre State, Venezuela. *Mem. XXII. Ann. Meet. Braz. Soc. Protoz. and XXXIII Ann. Meet. Bas. Res. Chag. Dis.*, 147.

Garrido, F.; Rivas, L.; Córdova, J.; Montiel, L.; Luces, G.; Mendoza, M.; Celis, L.; Márquez, B.; Yáñez, C.; Sifontes, C.; Paiva, M.; Godoy, O.; Ruiz, R.; Freitas, W.; Borges, R.; Acevedo, Y.; Hinojosa, S.; García, A.; Gonzalez, J.; Malavé, K.; Vergara, L.; Garrido, M.; Brunnicelli, S.; Guzmán, Y.; Gonzalez, Y.; Alarcón, B.; Mendoza, I.; Ossenkopp, J.; Suárez, J.; Márquez, J.; Castro, J.; Naranjo, L.; Noya, O.; Ruiz, R.; Abdul, S.; Díaz, Z.; Gusmão, R.; Martín, A.; Villarroel, E.; Gutiérrez, H. Vigilancia de enfermedad de Chagas. En: Guía para el diagnóstico, manejo y tratamiento de la enfermedad de Chagas en fase aguda a nivel de los Establecimientos de Salud. *M.P.P.S* (eds). Venezuela., 2007.

Garzoni, L.; Caldera, A.; Meirelles, M.; de Castro, S.; Docampo, R.; Meints, G.; Oldfield, E. y Urbina, J. 2004. Selective *in vitro* effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risidronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Ant. Agen.*, 23:273-285.

Gelb, M.; Scholten, J. y Sebolt-Leopold, J. 1998. Protein prenylation: from discovery to prospects for cancer treatment. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:40-48.

Ivens, A.; Peacock, C.; Worthey, E.; Murphy, L.; Aggarwal, G.; Berriman, M.; Sisk, E.; Rajandream, M.; Adlem, E.; Aert, R.; Anupama, A.; Apostolou, Z.; Attipoe, P.; Bason, N.; Bauser, C.; Beck, A.; Beverley, S.; Bianchetti, G.; Borzym, K.; Bothe, G.; Bruschi, C.; Collins, M.; Cadag, E.; Ciarloni, L.; Clayton, C.; Coulson, R.; Cronin, A.; Cruz, A.; Davies, R.; De Gaudenzi, J.; Dobson, D.; Duesterhoeft, A.; Fazelina, G.; Fosker, N.; Frasch, A.; Fraser, A.; Fuchs, M.; Gabel, C.; Goble, A.; Goffeau, A.; Harris, D.; Hertz-Fowler, C.; Hilbert, H.; Horn, D.; Huang, Y.; Klages, S.; Knights, A.; Kube, M.; Larke, N.; Litvin, L.; Lord, A.; Louie, T.; Marra, M.; Masuy, D.; Matthews, K.; Michaeli, S.; Mottram, J.; Muller-Auer, S.; Munden, H.; Nelson, S.; Norbertczak, H.; Oliver, K.; O'Neil, S.; Pentony, M.; Pohl, T.; Price, C.; Volckaert, G.; Wambutt, R.; Warren, T.; Wedler, H.; Woodward, J.; Zhou, S.; Zimmermann, W.; Smith, D.; Blackwell, J.; Stuart, K.; Barrell, B. y Myler, P., 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science.*, 309(5733):436-442.

Kalil, J. y Cunha-Neto, E. 1996. Autoimmunity in Chagas disease Cardiomyopathy: Fullfilling the Criteria at Last? *Parasitol. Today.*, 12:396-399.

Kucsera, J.; Yarita, K y Tadeo, K. 2000. Simple detection method for distinguishing dead and living yeast colonies. *J. Microb. Meth.*, 41:19-21.

Lorente, S.; Rodrigues, J.; Jiménez, C.; Joyce, M.; Rodrigues, C.; Croft, S.; Yardley, V.; Kate de Luca, K.; Ruiz, L.; Urbina, J.; De Souza, W. González, D.; y Gilbert I. 2004. Novel Azasterols as Potential Agents for Treatment of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Antim. Agen. and Chem.* 48 (8) 2937-2950.

Luquette, A. 1997. Etiological treatment of Chagas disease. The national health foundation of Brazil. *Parasitol. Today.*, 13:127-128.

Marchán, E.; Arrieche, D.; Simoni, Z.; Luna, R.; Alvarez A. y Visbal, G. 2003. Efecto de 22-hidrazona-imidazoline-2-il-5-colesta-3 β -ol sobre promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana*. *Act. Cient. Venez.*, 54(1):205.

Marchán, E.; Arrieche, D.; Simoni, Z.; Luna, R.; Alvarez A. y Visbal, G. 2004. Biochemical and ultraestructural changes induce by 20-hydrazone-imidazoline-2-yl-5-colen-3 β -ol on *Leishmania (L.) mexicana*. *Mem. Ann. Meet. Bas. Res. Chagas Dis.*, 145.

Mossman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and citotoxicity assay. *J. Imm. Meth.*, 65:55-63.

Ortíz, A. 2005. Farnesil difosfato sintetasa de *Leishmania major*. Estudios de una potencial diana terapéutica. Tesis Doctoral. Instituto de parasitología y biomedicina "López Neyra". Consejo superior de investigaciones científicas. Universidad de Granada. (<http://www.hera.ugr.es/tesisugr/>) (15/02/2008).

Osorio, D.; Edison, J.; Montoya, P.; Guillermo, L.; Arango, A. y Gabriel J. 2006. Productos naturales alcaloidales con actividad antiprotozoaria. *Vit. Rev. Fac. Quím.*, 13(1):61-84.

Roberts, C.; McLeod, R.; Rice, D.; Ginger, M.; Chance, M. y Goad, L. 2003. Fatty acid and sterol metabolism: Potencial antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Bioch. Parasitol.*, 126(2):129-142.

Rodrigues, J.; Catisti, R.; Uyemura, S.; Vercesi, A.; Lira, R.; Rodriguez, C.; Urbina, J. y Docampo, R. 2001. The sterol composition of *Trypanosoma cruzi* changes after growth in different culture media and results in different sensitivity to digitonin permeabilization. *J. Euk. Microbiol.* 48:588-594.

Rodrigues, J.; Attias, M.; Rodriguez, C.; Urbina, J. y Souza, W. 2002. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterolo, a $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyl transferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Ant. Agen. and Chem.*, 46(2):487-499.

Sosa Estani, S. y Segura, E. 1999. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the undetermined phase. Experience and current guidelines in Argentina. *Mem.Inst.Osw. Cr.*, 94(1):363-365.

Simoni, Z. 2007. Estudio del efecto de la combinación de 22-hidrazona-imidazolin-2-il-5-colesta-3 β -ol y Cu(dppz)₂(NO₃)NO₃ sobre promastigotes de *Leishmania (V) brasiliensis*. Trabajo de Grado. Postgrado en Biología Aplicada. Universidad de Oriente. Venezuela

Tarleton, R. y Zhang, L. 1999. Chagas disease ethiology: Autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol. Today.*, 15:94-99.

Tarleton, R. 2001. Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. *Int. J. Par.* 31:550-554.

Urbina, J.; Vivas J.; Visbal, G. y Contreras, L. 1995. Modification of the sterol composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by Δ 24(25)-methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Molec. and Bioch. Par.*, 73(1-2):199-210.

Urbina, J. 1997. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology.*,117:S91-S99.

Urbina, J.; Lira, R.; Visbal, G. y Bartrolí, J. 2000. In Vitro Antiproliferative Effects and Mechanism of Action of the New Triazole Derivative UR-9825 against the Protozoan Parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Anti. Agen. Chem.* 44: 2498-2502.

Urbina, J. 2002. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Design.*, 8:287-295.

Urbina, J.; Concepcion, J.; Caldera, A.; Lira, R.; Payares, G. y Sanoja, C. 2002. *In vitro* and *in vivo* activities of ER-27856, a novel squalene synthase inhibitor, against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *ICAAC Abstracts.*, 42:LB-25-20.

Urbina, J.; Concepción, J.; Rangel, S.; Visbal, G.; Lira, R. 2002. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania Mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 125: 35-45.

Urbina, J.; Concepcion, J.; Caldera, A.; Payares, G.; Sanoja, C.; Otomo, T. y Hiyoshi, H. 2004. *In vitro* and *in vivo* activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Ant. Ag. Chem.* 48 (7):2379-2387.

Urbina, J. y Docampo, R. 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Parasitology.*, 19(11):495-501.

Visbal, G.; Alvarez, A.; Moreno, B.; San-Blas, G. S-adenosyl-L-methionine inhibitors: Δ 24-sterol methyl transferase and Δ 24(28)-sterol methyl reductase as possible agents against. 2003. *Paracoccidioides brasiliensis*. *Anti. Agen. Chem.* 47: 2966-2970.

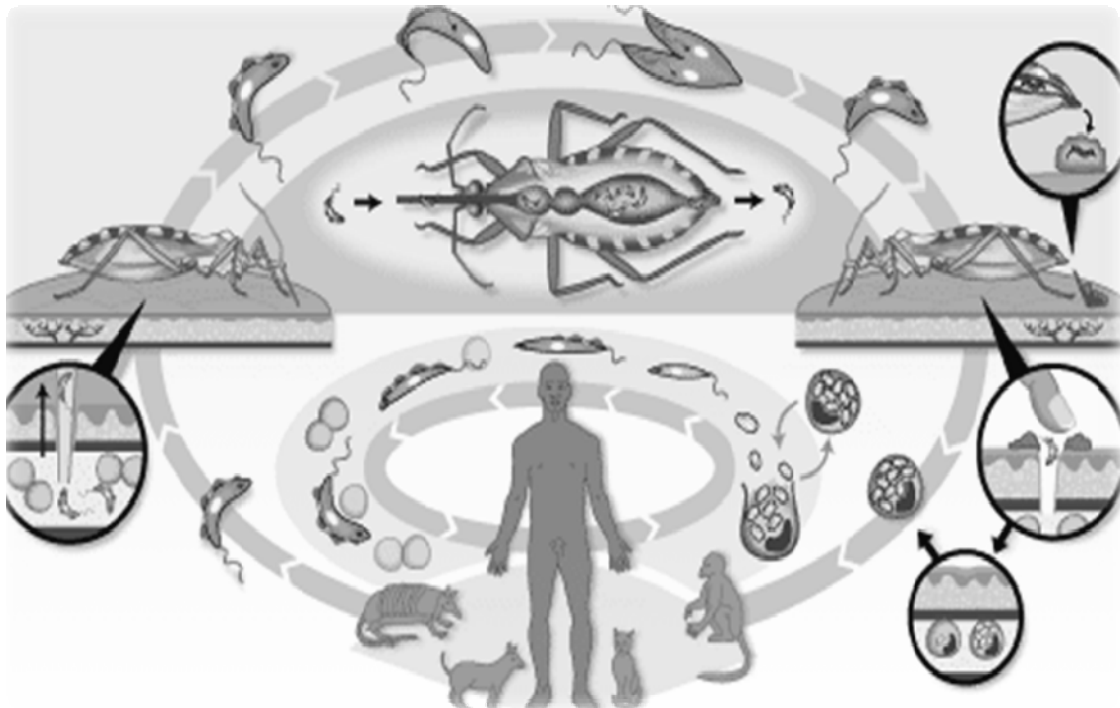
Visbal, G.; San-Blas, G.; Murgich, J. y Franco, H. 2005. *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. *Curr. Drug Targ. – Infect. Dis.*, 5(3):211-226.

Viotti, R.; Vigliano, C.; Armenti, H. y Segura, E. 1994. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: Clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am. Hear. J.*, 127:151-162.

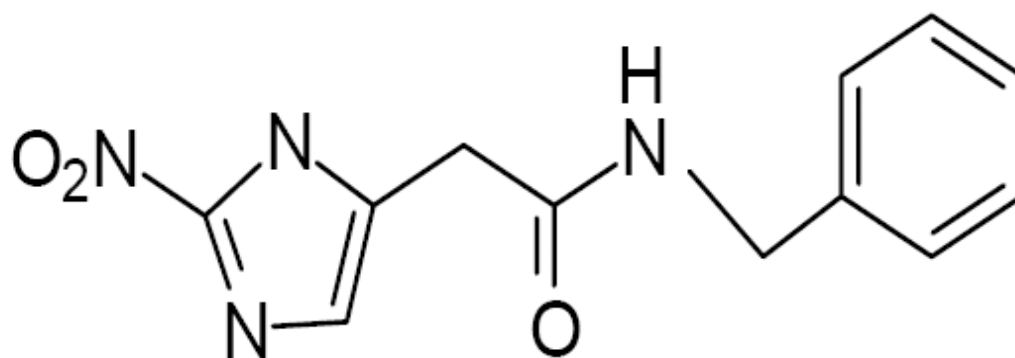
W.H.O. 2002. Control of Chagas disease. *Tech. Rep. Ser.*, 905:1-109.

WHO/O.P.S. 2006. Análisis preliminar de la situación de salud en Venezuela. (<http://www.ops-oms.org.ve/site/venezuela/ven-sit-salud-nuevo.htm>).(20/05/2007).

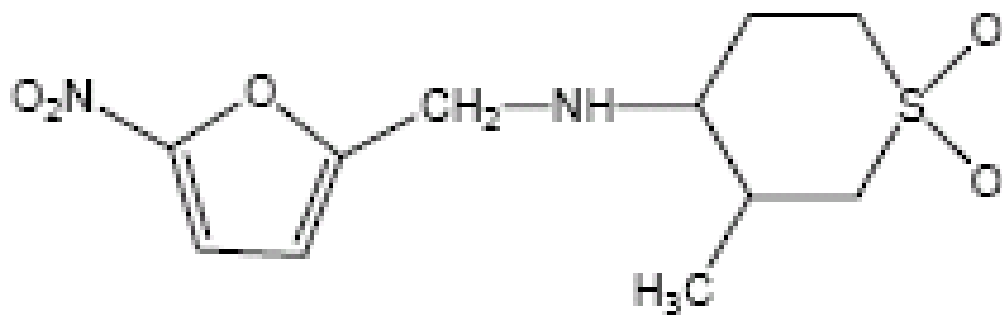
ANEXOS



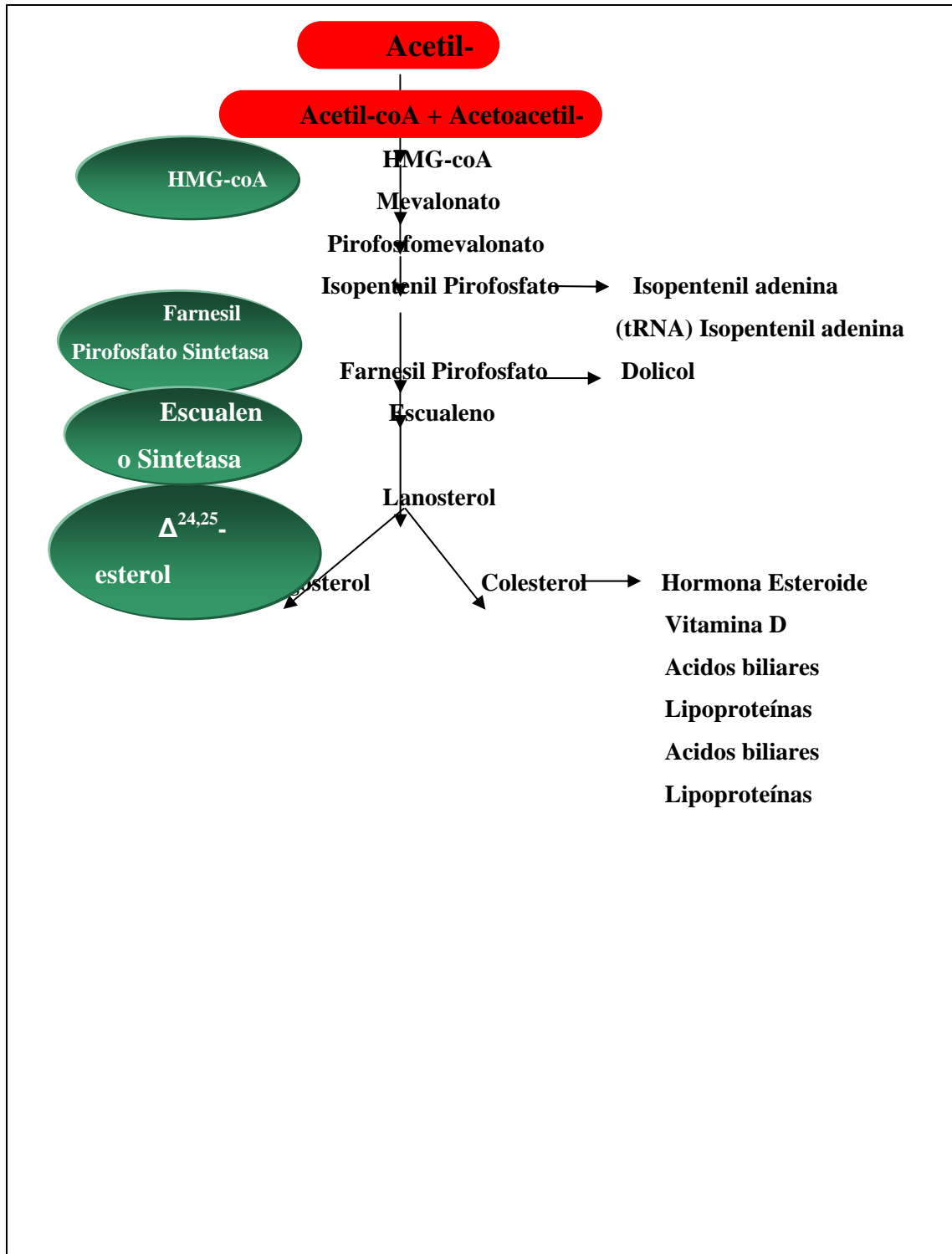
Anexo 1. Ciclo vital del *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2002).



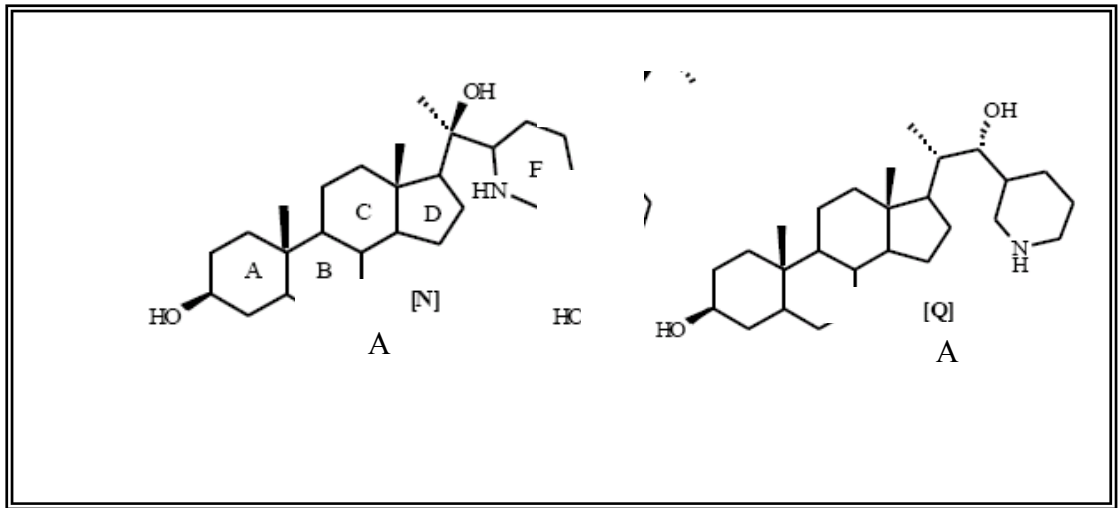
Anexo 2. Estructura química de benznidazol (Osorio *et al.*, 2006).



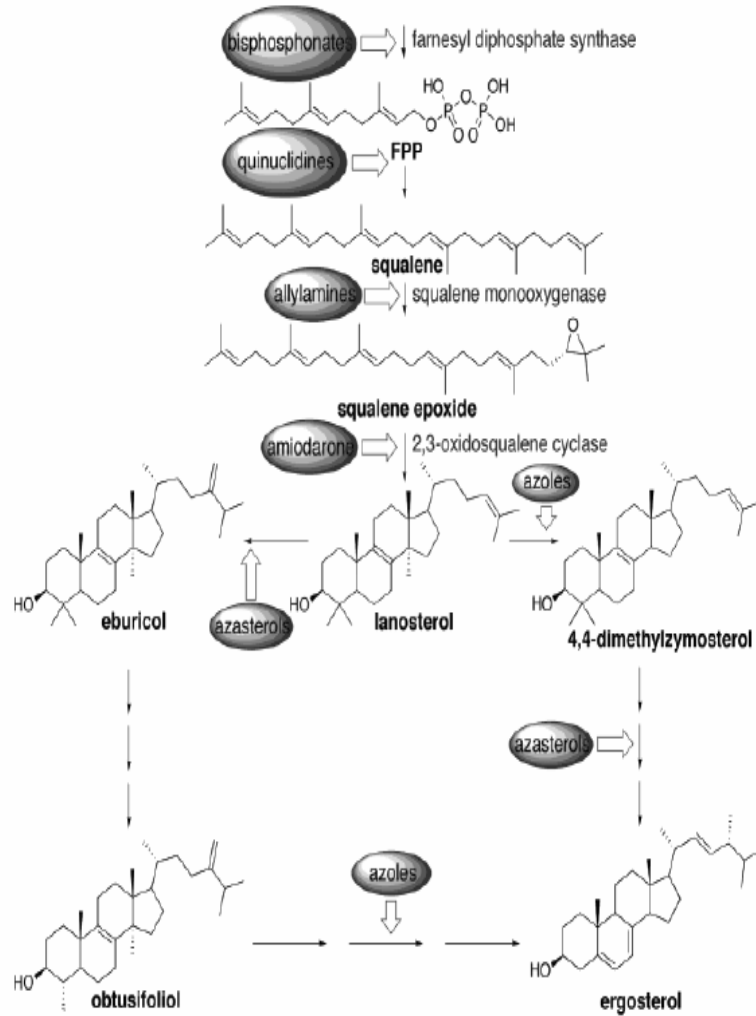
Anexo 3. Estructura química de nifurtimox (Coura y Castro, 2002).



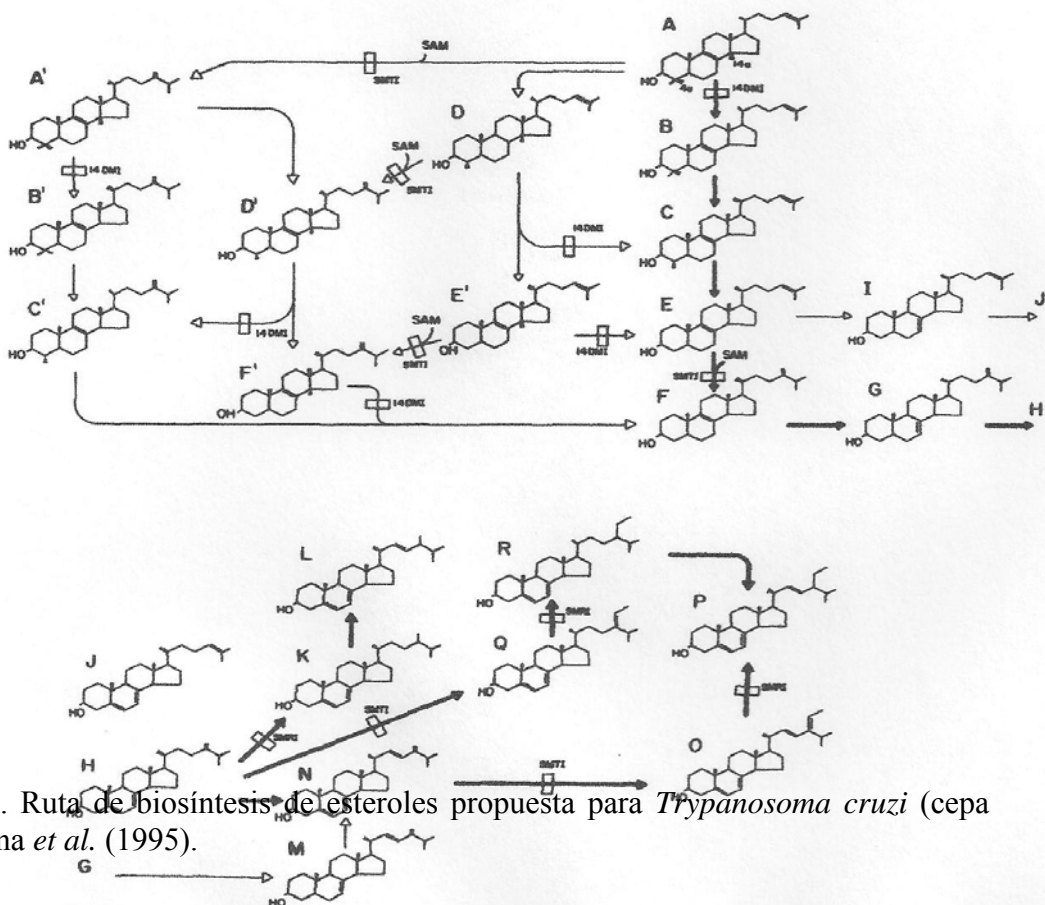
Anexo 4. Ruta de biosíntesis de esterole (Ortíz, 2005).



Anexo 5. Estructura química de Azasteroles: AZA1 y AZA3 (Visbal *et al.*, 2005)



Anexo 6. Estructuras de esteroides y sitios de acción de diferentes inhibidores de la biosíntesis de ergosterol. Benaim *et al.*, 2006.



Anexo 7. Ruta de biosíntesis de esteroides propuesta para *Trypanosoma cruzi* (cepa Y). Urbina et al. (1995).

Fig. 4. Postulated de novo biosynthesis pathway in *T. cruzi*. (A) 4,4',14-Trimethyl-cholesta-8,24-dien-3 β -ol (lanosterol); (B) 4,4'-dimethyl-cholesta-8,24-dien-3 β -ol; (C) 4-methyl-cholesta-8,24-dien-3 β -ol; (D) 4,14-dimethyl-cholesta-8,24-dien-3 β -ol; (E) cholesta-8,24-dien-3 β -ol (zymosterol); (F) ergosta-8,24(24¹)-dien-3 β -ol; (A') 24-methylene-dihydrolanosterol; (B') 4,4'-dimethyl-ergosta-8,24(24¹)-dien-3 β -ol; (C') 4-methyl-ergosta-8,24(24¹)-dien-3 β -ol; (D') 4,14-dimethyl-ergosta-8,24(24¹)-dien-3 β -ol (obtusifoliol); (E') 14-methyl-cholesta-8,24-dien-3 β -ol; (F') 14-methyl-ergosta-8,24(24¹)-dien-3 β -ol; (G) ergosta-7,24(24¹)-dien-3 β -ol (episterol); (H) ergosta-5,7,24(24¹)-trien-3 β -ol (5-dehydroepisterol); (I) cholesta-7,24-dien-3 β -ol; (J) cholesta-5,7,24-trien-3 β -ol; (K) ergosta-5,7-dien-3 β -ol (dihydroergosterol); (L) ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (ergosterol); (M) ergosta-7,22,24(24¹)-trien-3 β -ol; (N) ergosta-5,7,22,24(24¹)-tetraen-3 β -ol; (O) 24-ethyl-cholesta-5,7,22,24(24¹)-tetraen-3 β -ol; (P) 24-ethyl-cholesta-5,7,22-trien-3 β -ol; (Q) 24-ethyl-cholesta-5,7,24(24¹)-tetraen-3 β -ol; (R) 24-ethyl-cholesta-5,7-dien-3 β -ol. SMTI, sterol methyltransferase inhibitors; SMRI, sterol methylreductase inhibitors; 14DMI, sterol 14-demethylase inhibitors. Thick lines indicate main reaction pathways. See text for details.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso-1/5

Título	EVALUACIÓN DEL EFECTO <i>in vitro</i> DE 20-PIPERIDIN-2-IL-5 α -PREGNANO-20(R)-3 β -DIOL (AZA1) y 22-PIPERIDIN-3-IL-PREGNANO-22(S)-3 β -DIOL (AZA3) SOBRE AISLADO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> DE ZONA ENDÉMICA DEL ESTADO PORTUGUESA
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Marquez Carlos Eduardo	CVLAC	11832310
	e-mail	carmarquez74@yahoo.es
	e-mail	carmarquez74@hotmail.com

Palabras o frases claves:

Quimioterapia racional
<i>Trypanosoma cruzi</i>
Azasteroles

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso-2/5

Líneas y sublíneas de investigación

Área	Subárea
Postgrado de Biología Aplicada	Microbiología Aplicada

Resumen (abstract):

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una zoonosis producida por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi* que constituye un grave problema de salud pública en América Latina. Las drogas comúnmente utilizadas para su tratamiento, Benznidazol y Nifurtimox, son efectivas sólo en la fase aguda e inducen serios efectos colaterales, que pueden conllevar a la interrupción del tratamiento. En este sentido, se evaluó el efecto *in vitro* de 20-piperidin-2-il-5 α -pregnano-20(R)-3 β -diol (AZA1) y 22-piperidin-3-il-pregnano-22(S)-3 β -diol (AZA3) como posibles inhibidores de la $\Delta^{24(25)}$ -esterol metiltransferasa (24-EMT), sobre epimastigotes de *T. cruzi* (aislado B28V506) de una región endémica del estado Portuguesa; mantenidos en fase exponencial en medio LIT suplementado con suero fetal bovino 10% a 26° C, con agitación. Para ello, se determinó la densidad celular por conteo directo en cámara de Neubauer e indirectamente por espectrofotometría a 560 nm. La viabilidad, se cuantificó por el método de exclusión con azul de tripano. La purificación de esteroides libres, se hizo mediante cromatografía en columna con ácido silícico, mientras que la caracterización y cuantificación por cromatografía de gases y espectrometría de masas. La ultraestructura, se realizó por métodos convencionales para microscopía electrónica de transmisión. Asimismo, la citotoxicidad de los azasteroides sobre células Vero, se determinó mediante cuantificación de viabilidad por exclusión de azul de tripano. Se encontró a las 120 h un efecto antiproliferativo dosis-dependiente sobre epimastigotes de *T. cruzi* y se estimaron para BZN (CMI: 29,2 μ M y CI₅₀: 15,7 μ M); AZA1 (CMI: 18,2 μ M y CI₅₀: 10,6 μ M) y para AZA3 (CMI: 2,3 μ M y CI₅₀:1,45 μ M). Los azasteroides indujeron gran acumulación de zimosterol, no detectado en parásitos no tratados con disminución drástica de los esteroides esenciales tipo ergosta, acompañado de alteraciones ultraestructurales considerables apenas con una CI₁₆, como evaginaciones en la membrana plasmática, vacuolización y pérdida de la integridad mitocondrial. Con las CMI de AZA1 y AZA3 en células Vero, se encontró un bajo efecto citotóxico en relación a células no tratadas. Estos hallazgos sugieren que la potente actividad tripanocida (12.7 veces AZA3 y 1.6 veces AZA1, mayores que la droga de tratamiento convencional BZN) podría estar asociada con la inhibición de la actividad de la enzima 24-EMT, específica de estos eucariotes inferiores, lo cual es soportado por su baja toxicidad en células Vero, constituyendo así una herramienta prometedora en la búsqueda de nuevas drogas que permitan resolver el grave problema de salud pública que representa la enfermedad de Chagas en América Latina.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail										
Marchan Marcano Edgar	A		S		U		U				
	CVLAC										
	e-mail	emarchanmarcano@yahoo.es									
Morocoima Antonio	A		S		U		U				
	CVLAC										
	e-mail										
Herrera Hernando	A		S		U		U				
	CVLAC										
	e-mail										

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2009	11	13
-------------	-----------	-----------

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
PG.CEM-DOC	APPLICATION/WORD

Alcance:

Espacial: Nacional (Opcional)

Temporal: Intemporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

MAGISTER SCIENTIARUM

Nivel Asociado con el Trabajo: MAGISTER SCIENTIARUM

Área de Estudio:

MICROBIOLOGÍA APLICADA

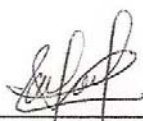
Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

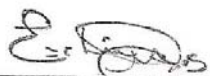
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

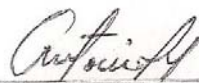
Yo, Carlos Eduardo Márquez como autor principal de esta tesis le doy el derecho a la Universidad de Oriente para divulgar el resumen de la misma siempre y cuando esté en resguardo la patente de industria y comercio si se diera el caso.



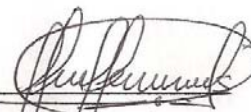
CARLOS EDUARDO MÁRQUEZ
AUTOR



EDGAR MARCHAN
TUTOR



ANTONIO MOROCOIMA
JURADO 1



HERNANDO HERRERA
JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:



MARIO LGA BERRIZBEITIA

