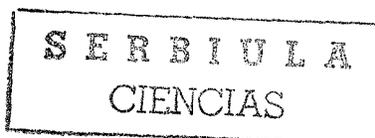


X  
QL368  
K5R353

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



**Escualeno Sintetasa en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*:  
ubicación subcelular, cinética e inhibición.**

DONACION

**Tutor:** Julio A. Urbina

**Co-tutor:** Juan Luis Concepción

**Tesista:** María Salomé Rangel González.

Mérida, 2002.

**SERBIULA - BIACI**



QL368 K5R353



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**Escualeno Sintetasa en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*:  
ubicación subcelular, cinética e inhibición.**

Trabajo Especial de Grado presentado por la  
Br. María Salomé Rangel, como requisito parcial  
para optar al Título de Licenciada en Biología.

**Tutor:** Julio A. Urbina

**Co-tutor:** Juan Luis Concepción

**Tesista:** María Salomé Rangel González.

Mérida, 2002.



**AGRADECIMIENTOS:**

A mis padres, por su apoyo incondicional.

A mis tutores, por su paciencia y enseñanza.

A mis compañeros de carrera y del Laboratorio tanto de Enzimología de Parásitos como del IVIC, por los ratos compartidos.

Al Instituto Venezolano de Investigación Científica (IVIC), por permitirme realizar parte de los experimentos en sus instalaciones.

A mis amigos merideños, por llegar a ser mis hermanos en esta etapa tan hermosa de mi vida.

## **RESUMEN:**

Los parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana* tienen requerimientos estrictos de esteroides endógenos específicos (ergosterol y análogos) para sobrevivir y crecer, y no pueden usar el abundante suplemento de colesterol presente en sus células hospedadoras mamíferas. La escualeno sintetasa (SQS, E.C. 2.5.1.21) cataliza el primer paso comprometido en la biosíntesis de esteroides; y está actualmente bajo fuerte estudio como un posible blanco de agentes hipocolesterogénicos en humanos, pero no ha sido estudiada como un blanco para quimioterapia antiparasítica. SQS es una enzima asociada a la membrana tanto en *T. cruzi* (epimastigotes) como en *L. mexicana* (promastigotes), con una ubicación subcelular dual, estando distribuida casi en igual proporción en vesículas de glicosomas y mitocondrias/microsomas. Estudios cinéticos demuestran que las enzimas de *T. cruzi* tienen un comportamiento Michaelis-Menten y los valores de las constantes cinéticas para el FPP son comparables a aquellos de las enzimas de mamíferos. La 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxiquinuclidina (BPQ-OH), un específico y potente inhibidor de la SQS de mamíferos, es también un poderoso inhibidor no-competitivo de las SQS de *T. cruzi*, con  $K_{is}$  de 12 y 48 nM para las enzimas de microsomas y glicosomas, respectivamente. BPQ-OH induce una reducción dosis-respuesta de la proliferación de los estadios extracelulares de estos parásitos, con  $IC_{50}$  de 19 y 12  $\mu$ M para *T. cruzi* y *L. mexicana*, respectivamente. La inhibición del crecimiento y lisis celular inducidas por BPQ-OH en ambos parásitos estuvo asociada con el completo agotamiento del escualeno y esteroides endógenos, consistente con el bloqueo de la síntesis *de novo* de esteroides a nivel de la SQS. BPQ-OH fue capaz de erradicar los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* de células Vero cultivadas a 37°C, con un MIC de 15  $\mu$ M sin efectos dañinos en las células hospedadoras. Juntos, estos resultados soportan la noción de que los inhibidores de la SQS pueden desarrollarse como agentes anti-parasíticos selectivos.

## **INDICE GENERAL:**

1. Introducción .....	1
1.1. Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis.....	1
1.2. Inhibidores de la Síntesis de Esteroles.....	4
1.3. Escualeno Sintetasa .....	8
2. Hipótesis .....	14
3. Objetivos .....	15
4. Metodología .....	16
4.1. Material Biológico .....	16
4.2. Equipos y materiales .....	17
4.3. Ubicación subcelular de la Escualeno Sintetasa .....	19
4.3.1. Centrifugación Diferencial e Isopícnica .....	19
4.3.2. Determinación de la concentración de proteínas .....	20
4.3.3. Ensayos enzimáticos para los marcadores de las diferentes organelas .....	21
4.3.4. Separación de Fase con Tritón X-114 .....	26
4.4. Cinética e inhibición de la actividad Escualeno Sintetasa .....	27
4.4.1. Estandarización de las condiciones de reacción .....	27
4.4.2. Determinación de parámetros cinéticos de la enzima SQS .....	28
4.4.3. Inhibición de SQS con BPQ-OH.....	28
4.5. Inhibición de la proliferación de <i>T. cruzi</i> y <i>L. mexicana</i> por BPQ-OH sobre células intactas <i>in vitro</i> .....	29
4.5.1. Efecto inhibitorio de BPQ-OH sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , y promastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	29
4.5.2. Efecto de BPQ-OH sobre la síntesis <i>de novo</i> de esteroles en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , y promastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	31
4.5.3. Efecto de BPQ-OH sobre la proliferación de amastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	33
5. Resultados .....	35
5.1. Ubicación subcelular de la SQS en <i>T. cruzi</i> y <i>L. mexicana</i> .....	35

5.1.1. Asociación de SQS a membranas.....	38
5.2. Cinética e inhibición de la actividad SQS .....	48
5.2.1. Determinación de parámetros cinéticos de la enzima SQS .....	48
5.2.2. Inhibición de SQS con BPQ-OH .....	49
5.3. Acción antiproliferativa de BPQ-OH contra células intactas <i>in vitro</i> .....	60
5.3.1. Efecto inhibitorio de BPQ-OH sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , y promastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	60
5.3.2. Efecto de BPQ-OH sobre la síntesis <i>de novo</i> de esteroides en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , y promastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	66
5.3.3. Efecto de BPQ-OH sobre la proliferación de amastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	74
6. Discusión .....	76
6.1. Ubicación subcelular de la SQS en <i>T. cruzi</i> y <i>L. mexicana</i> .....	76
6.2. Cinética e inhibición de la actividad SQS .....	78
6.2.1. Determinación de parámetros cinéticos de la enzima SQS .....	78
6.2.2. Inhibición de SQS con BPQ-OH .....	80
6.3. Acción de BPQ-OH contra células intactas <i>in vitro</i> .....	81
6.3.1. Efecto inhibitorio de BPQ-OH sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , y promastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	81
6.3.2. Efecto de BPQ-OH sobre la síntesis <i>de novo</i> de esteroides en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , y promastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	85
6.3.3. Efecto de BPQ-OH sobre la proliferación de amastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	86
7. Conclusiones .....	89
8. Bibliografía.....	90

**INDICE DE TABLAS:**

**Tabla 1.** Ubicación de la actividad SQS en las fases obtenidas mediante su separación con Tritón X-114, en glicosomas y microsomas purificados .....39

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos de la SQS de glicosomas y microsomas de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial .....48

**Tabla 3.** Valores de IC<sub>50</sub> y Ki para la inhibición con BPQ-OH de la actividad SQS en *T. cruzi* y *L. mexicana* .....50

**Tabla 4.** Efecto de BPQ-OH en la composición de esteroides libres de epimastigotes de *T. cruzi* .....69

**Tabla 5.** Efecto de BPQ-OH en la composición de esteroides libres de promastigotes de *L. mexicana* .....71

**Tabla 6.** Valores de IC<sub>50</sub> y MIC para diferentes inhibidores de la síntesis de esteroides y análogos de lisofosfolípidos sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de algunos géneros de *Leishmania*.....84

**Tabla 7.** Valores de MIC para diferentes inhibidores de la síntesis de esteroides y análogos de lisofosfolípidos sobre la proliferación de amastigotes de *T. cruzi* cultivados en células Vero.....87

**INDICE DE FIGURAS:**

**Figura 1.** Ruta de síntesis de esteroides en vertebrados y protozoarios  
kinetoplásticos .....5

**Figura 2.** Reacción de la enzima escualeno sintetasa .....9

**Figura 3.** Estructura de BPQ-OH .....12

**Figura 4.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diferentes  
organelas para las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial de un  
homogenato de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial .....40

**Figura 5.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diversas  
organelas, de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial, después de  
equilibrarse en un gradiente lineal de densidad de sacarosa .....41

**Figura 6.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diferentes  
organelas para las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial de un  
homogenato de epimastigotes de *T. cruzi* en fase pre-exponencial .....42

**Figura 7.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diversas  
organelas, de epimastigotes de *T. cruzi* en fase pre-exponencial, después de  
equilibrarse en un gradiente lineal de densidad de sacarosa .....43

**Figura 8.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diferentes  
organelas para las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial de un  
homogenato de epimastigotes de *T. cruzi* en fase estacionaria .....44

**Figura 9.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diversas organelas, de epimastigotes de *T. cruzi* en fase estacionaria, después de equilibrarse en un gradiente lineal de densidad de sacarosa .....45

**Figura 10.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diferentes organelas para las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial de un homogenato de promastigotes de *L. mexicana* en fase exponencial .....46

**Figura 11.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diversas organelas, de promastigotes de *L. mexicana* en fase exponencial, después de equilibrarse en un gradiente lineal de densidad de sacarosa .....47

**Figura 12.** Estandarización de las condiciones óptimas de reacción (tiempo y  $\mu\text{g}$  de proteínas) de la enzima SQS .....51

**Figura 13.** Gráficas de Lineweaver-Burk para la determinación del  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  del NADPH, para la SQS de glicosomas purificados a partir de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial .....52

**Figura 14.** Gráficas de Lineweaver-Burk para la determinación del  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  del FPP, para la SQS de glicosomas purificados a partir de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial .....53

**Figura 15.** Gráficas de Lineweaver-Burk para la determinación del  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  del NADPH, para la SQS de microsomas purificados a partir de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial .....54

**Figura 16.** Gráficas de Lineweaver-Burk para la determinación del  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  del FPP, para la SQS de microsomas purificados a partir de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial .....55

<b>Figura 17.</b> Gráficas de Lineweaver-Burk para la determinación del Ki para BPQ-OH, de la SQS de microsomas purificados a partir de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> en fase exponencial .....	56
<b>Figura 18.</b> Gráficas de Lineweaver-Burk para la determinación del Ki para BPQ-OH, de la SQS de glicosomas purificados a partir de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> en fase exponencial .....	57
<b>Figura 19.</b> Curvas de Dosis-Respuesta de la actividad de las enzimas SQS tratadas con BPQ-OH, de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> en fase exponencial .....	58
<b>Figura 20.</b> Curvas de Dosis-Respuesta de la actividad de las enzimas SQS tratadas con BPQ-OH, de promastigotes de <i>L. mexicana</i> en fase exponencial ....	59
<b>Figura 21.</b> Efecto de BPQ-OH en la proliferación de: A) epimastigotes de <i>T. cruzi</i> ; y B) promastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	62
<b>Figura 22.</b> Comparación del efecto de BPQ-OH en la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , por 3 métodos diferentes: A) Curva de crecimiento; B) Número de células/ml por el método de Pizzi-Brenner; y C) Actividad Esterasa...	63
<b>Figura 23.</b> Determinación de los valores de IC <sub>50</sub> para el BPQ-OH a partir de: A) Tasa de crecimiento; y B) Porcentaje de crecimiento, para epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	64
<b>Figura 24.</b> Determinación de los valores de IC <sub>50</sub> para el BPQ-OH a partir de: A) Tasa de crecimiento; y B) Porcentaje de crecimiento, para promastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	65
<b>Figura 25.</b> Espectros de masas de esteroides libres detectados en los extractos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> , y promastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	68

**Figura 26.** Cromatogramas de lípidos neutros obtenidos a partir de extractos de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con: A) 0 $\mu$ M de BPQ-OH (Control); y B) 10 $\mu$ M de BPQ-OH; separados por cromatografía de gases .....70

**Figura 27.** Cromatogramas de lípidos neutros obtenidos a partir de extractos de promastigotes de *L. mexicana* tratados con: A) 0 $\mu$ M de BPQ-OH (Control); y B) 30 $\mu$ M de BPQ-OH; separados por cromatografía de gases .....72

**Figura 28.** Efecto de BPQ-OH en la relación de esteroides endógenos/exógenos de epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. mexicana*.....73

**Figura 29.** Efecto de BPQ-OH en amastigotes intracelulares de *T. cruzi* .....75

## **ABREVIATURAS:**

ALAT: Alanin-amino Transferasa

BPQ: 3-(Bifenil-1-il)-3-hidroxi-Quinuclidina

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DO: Densidad Optica

DOC: Deoxicolato

FC: Fracción Citosólica

FGG: Fracción Granular Gruesa

FM: Fracción Microsomal

FN: Fracción Nuclear

FPP: Farnesil Pirofosfato

FRD: Fase Rica en Detergente

FRG: Fracción Rica en Glicosomas

FS: Fase Soluble

GP: Glicosomas Purificados

HK: Hexoquinasa

IBE: Inhibidores de la Biosíntesis de Esteroles

IC<sub>50</sub>: Concentración de droga con que se consigue 50% de inhibición.

IDH: Isocitrato Deshidrogenasa

MDH: Malato Deshidrogenasa

MIC: Concentración de droga con que se consigue 100% de inhibición.

PEP: Fosfoenol Piruvato

PEPCK: Fosfoenol Piruvato Carboxiquinasa

PNPA: Para-Nitro-Fenil Acetato

PPDK: Piruvato Fosfato Diquinasa

PPi: Pirofosfato

PSQPP: Pre-escualeno Pirofosfato

PYK: Piruvato Kinasa

RE: Retículo Endoplasmático

SDH: Succinato Deshidrogenasa

SQS: Escualeno Sintetasa

TCA: Acido Tricloracético

ZGA: Acidos Zaragóxicos

## **1. INTRODUCCIÓN:**

### **1.1. Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis:**

La enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis Tegumentaria Americana, son enfermedades parasitarias causadas por los protozoarios kinetoplástidos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*, respectivamente.

Estos organismos, miembros de la familia trypanosomatidae, comprenden un grupo de flagelados que presentan ciclos de vida complejos con estadios especializados para sobrevivir tanto en el hospedador vertebrado, como invertebrado (Pinto Dias, 1992).

*Trypanosoma cruzi*, en el insecto vector, prolifera en el lumen del tracto gastrointestinal en la forma de epimastigote (no-infectivo) el cual se transforma en tripomastigote metacíclico (infectivo) en respuesta al estrés nutricional. Los tripomastigotes metacíclicos son depositados junto con las heces cuando el vector hematófago se alimenta de la sangre de un mamífero y penetran al sistema circulatorio a través de lesiones de la piel. Esta forma no proliferativa evade el sistema inmune invadiendo una variedad de tipos de células, incluyendo las musculares y nerviosas del corazón y el tracto gastrointestinal, así como aquellas del sistema retículo-endotelial. Luego de la invasión, los parásitos escapan rápidamente de la vacuola fagocítica y se transforman en amastigotes, los cuales proliferan por fisión binaria y, eventualmente, se diferencian en tripomastigotes sanguíneos, que normalmente destruyen las células del hospedador y alcanzan el torrente sanguíneo. Los tripomastigotes sanguíneos pueden invadir otros tejidos o ser digeridos junto con la sangre por el insecto vector, en el cual se diferenciarán nuevamente en epimastigotes, completando el ciclo (Burleigh y Andrews, 1995).

El género *Leishmania* es transmitido por insectos dípteros del género *Phlebotomus*, y sólo las hembras (hematófagas) intervienen en su transmisión. Cuando un flebotomino se alimenta de un animal infectado, ingiere las formas tisulares aflageladas (amatigotes) las cuales una vez que se encuentran en el

estómago del insecto, se transforman en promastigotes. Los promastigotes provocan un bloqueo completo del proventrículo y al picar de nuevo a un animal, el insecto regurgita la sangre succionada, así los parásitos son depositados en la dermis. Los promastigotes invaden diversas células fagocíticas donde pierden el flagelo, convirtiéndose en amastigotes los cuales se multiplican por división binaria. Después de un tiempo, provocan la ruptura celular e invaden nuevas células. La infección es transmitida al vector insecto por ingestión de células del hospedador que contienen parásitos (Vigar, 1979).

La enfermedad de Chagas se caracteriza por presentar dos fases secuenciales. Una fase aguda, caracterizada por un grado de parasitemia máximo, donde las formas de multiplicación del parásito se encuentran con facilidad; también, la formación de un infiltrado inflamatorio alrededor de los parásitos constituido por linfocitos y monocitos. Además, el desarrollo de un chagoma en el sitio de la picada del vector. El grado de parasitemia comienza a disminuir por la continua y creciente producción de anticuerpos.

La característica más constante de la fase crónica es la miocardiopatía, así como el desarrollo de un fenómeno de hipersensibilidad. En la primera etapa de la fase crónica, la miocardiopatía puede llevar a una ligera extrasistolia y taquicardia; mientras que en pacientes, en fase avanzada, se puede dar el bloqueo cardíaco parcial o total, provocando insuficiencia cardíaca. Algunas veces se observa megaesófago y megacólon (Vigar, 1979).

La Leishmaniasis Tegumentaria Americana posee espectros superpuestos, que son las expresiones de las respuestas inmunológicas del hospedador hacia el parásito. La enfermedad muestra un espectro de manifestaciones cutáneas y otro de manifestaciones mucosas y adopta 3 formas clínicas: cutánea localizada (úlceras cutáneas), cutánea difusa (nódulos no ulcerados) y cutánea-mucosa (lesiones cutáneas grandes inicialmente y luego invade las mucosas de la boca, nariz, faringe y laringe) (Vigar, 1979).

La enfermedad de Chagas está ampliamente distribuida en Norte y Sur América, desde el sur de los Estados Unidos, al sur de Argentina. Cerca de 90 millones de personas (casi  $\frac{1}{4}$  de la población latinoamericana) están en riesgo

de contraer esta enfermedad, mientras que 18-20 millones están efectivamente infectadas. Ha sido estimado que hay más de 550 mil nuevos casos y 50 mil muertes asociadas con esta enfermedad cada año. Es la enfermedad parasítica de mayor incidencia en el continente y la tercera a escala mundial, luego de la malaria y la esquistosomiasis (Urbina, 1999).

Los tratamientos de quimioterapia para estas enfermedades son aún muy insatisfactorios. Para la enfermedad de Chagas se basan en nitrofuranos y nitroimidazoles, desarrollados empíricamente hace tres décadas. Para la enfermedad de Chagas, su eficacia varía de acuerdo al área geográfica, probablemente debido a diferencias en la susceptibilidad a drogas entre diferentes cepas de *T. cruzi* (Urbina, 2000). La mayor limitación de estos compuestos es la muy baja o nula actividad en la forma crónica de la enfermedad, la cual es predominante en América Latina y se considera hasta ahora una infección incurable; además de provocar graves efectos secundarios como anorexia, vómito, polineuropatía periférica y alergia dermatológica; probablemente como consecuencia de daño oxidativo o reductivo en tejidos del hospedador (Urbina, 1999).

Los tratamientos quimioterapéuticos de la leishmaniasis se basan generalmente en el uso de antimoniales pentavalentes tales como estibogluconato de sodio (Pentostam) y meglumina antimoníaca (Glucantime); tratamientos empíricos desarrollados hace más de 50 años (Croft S.L., 1988; Croft y colaboradores, 1997). Los antimoniales pentavalentes requieren administración parenteral y tratamientos prolongados, lo cual provoca comúnmente efectos secundarios, incluyendo cardiotoxicidad; y aunque la leishmaniasis visceral y cutánea responden a estos tratamientos, la enfermedad mucosa severa no (Herwaldt y colaboradores, 1992). Más aún, la resistencia tanto de leishmaniasis visceral como mucocutánea a los antimoniales pentavalentes a estado incrementando en todas las áreas endémicas (Olliaro y colaboradores, 1993). Una segunda línea de drogas como la anfotericina B y la pentamidina son menos efectivas y mucho más tóxicas; recientemente nuevas fórmulas de dichas drogas, como la anfotericina B asociada a lípidos, resultan

menos tóxicas y significativamente más activas contra organismos susceptibles, pero deben ser administradas por vía intravenosa y son muy costosas ( Croft, 1988; Olliaro y colaboradores, 1993; Croft y colaboradores, 1997).

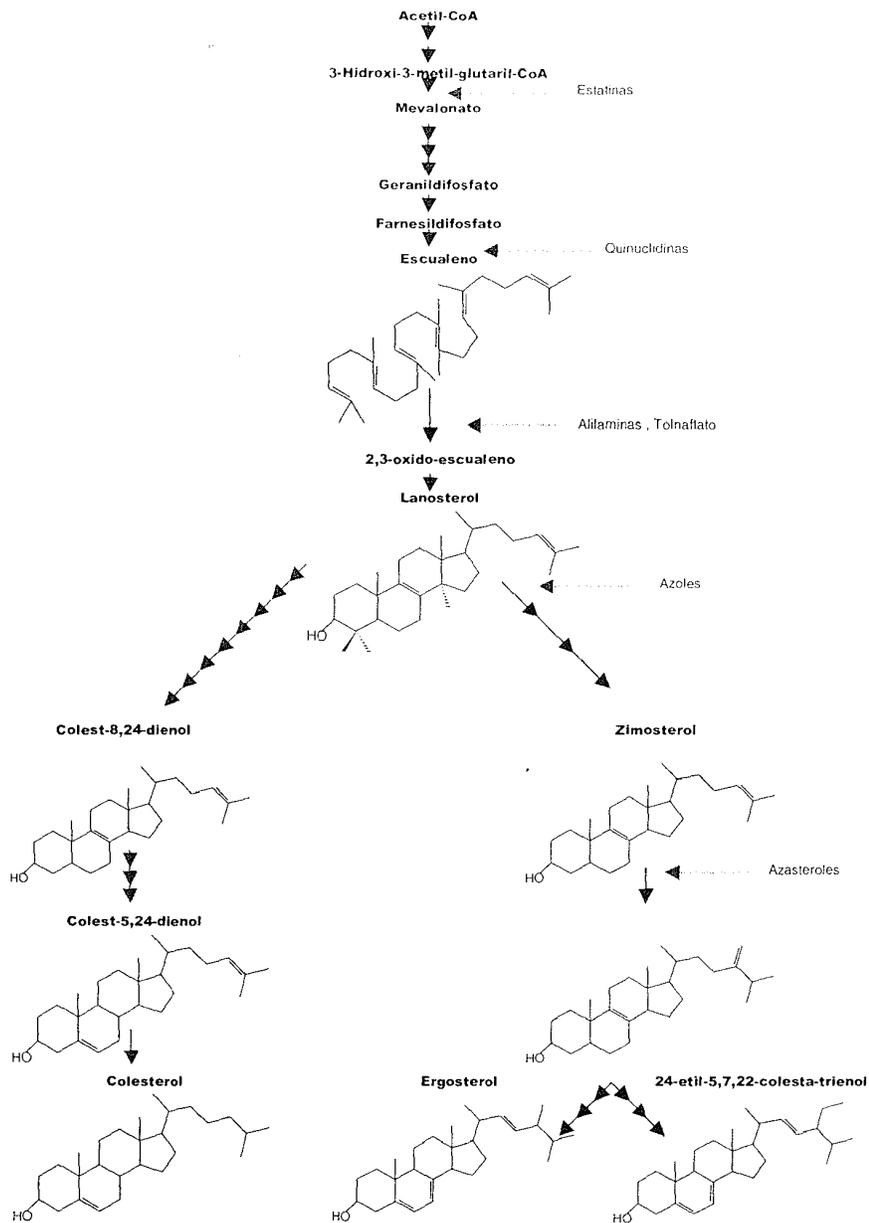
Una aproximación racional a la quimioterapia de enfermedades infecciosas debe tomar en cuenta la validación de dos candidatos: el blanco y la droga.

La validación de la molécula blanco debe incluir: 1) carácter esencial del paso metabólico para el patógeno; 2) la posibilidad de una inhibición potente y selectiva, bien a través de la pérdida de la actividad de la enzima blanco en el patógeno o la existencia de diferencias entre enzimas homólogas del patógeno y hospedero, para permitir una actividad selectiva (Urbina, 1999).

La validación de las drogas candidatas para la cura de estas infecciones debe incluir el conocimiento de sus propiedades farmacocinéticas-farmacodinámicas, las cuales dependen de la biología entre el hospedador-patógeno, así como del mecanismo de acción de la droga. Algunas de estas propiedades son: (1) grandes volúmenes de distribución (acumulación tisular); (2) largos tiempos de vida media terminal (eliminación/biotransformación lentas); (3) biodisponibilidad oral (Urbina, 1999).

## **1.2. Inhibidores de la síntesis de esteroides:**

El laboratorio dirigido por el Dr. Urbina ha venido desarrollando una línea de investigación en función del desarrollo de una quimioterapia racional para el tratamiento de estas enfermedades. Dicha estrategia tiene sus bases en las diferencias de las propiedades fisicoquímicas de ciertas enzimas del parásito con las homólogas presentes en la célula hospedadora. En este sentido, se toman en cuenta rutas metabólicas esenciales para la supervivencia del parásito, de tal manera que éste pueda erradicarse definitivamente del hospedador, sin afectarlo.



**Figura 1.** Diagrama esquemático de la ruta de biosíntesis de esteroides.

(Las flechas negras indican los pasos metabólicos compartidos, las verdes los que se dan en células de mamíferos, y las azules los que se dan en protozoarios patógenos como *Trypanosoma cruzi* y hongos. Las flechas rojas indican el sitio de acción de Inhibidores de la biosíntesis de esteroides usados actualmente como agentes quimioterapéuticos o en desarrollo).

La vía de síntesis de esteroides es una ruta biosintética de lípidos neutros de membranas, que tiene un costo energético muy alto; por tanto, representa un foco de interés en pro del desarrollo quimioterapéutico. Esta es una de las rutas metabólicas más complejas en células eucariotas, involucrando al menos 20 pasos metabólicos catalizados por enzimas específicas (Urbina, 1997).

Tomando en cuenta el costo energético y la complejidad de la biosíntesis de los esteroides, es evidente que estos compuestos cumplen papeles críticos en el metabolismo celular, aparte de su papel pasivo en las propiedades físicas de las membranas celulares. Además, los requerimientos específicos de esteroides particulares para cada grupo filogenético, proveen las bases del éxito de inhibidores de la biosíntesis de esteroides como agentes quimioterapéuticos contra hongos patógenos y levaduras (Urbina, 1997).

En células de mamíferos se observó durante muchos años que la ruta biosintética del colesterol estaba compartimentalizada en el RE. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que en células CHO (ovario de hamster Chino), la ruta está casi en su totalidad en peroxisomas; aunque no se ha podido medir la actividad SQS y se cree que este paso se da en el RE (Aboushadi y Krisans, 1998).

Hay evidencias considerables de que los peroxisomas en células de mamíferos no sólo tienen un papel en la oxidación del colesterol a ácidos biliares, sino también en la biosíntesis de colesterol. Específicamente se ha demostrado que los peroxisomas contienen las siguientes enzimas de esta ruta: 1) acetoacetyl-CoA tiolasa, la enzima requerida para el paso inicial en la síntesis del colesterol; 2) 3-hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), la enzima limitante de la velocidad de la síntesis de colesterol; y 3) mevalonato kinasa. La localización de estas enzimas en peroxisomas fue demostrada por una combinación de microscopía inmunoelectrónica y Western blotting, así como la medición de sus actividades enzimáticas (Appelkvist y colaboradores, 1990). Adicionalmente, las actividades bioquímicas de la hidrolanosterol oxidasa, esteroide 14-reductasa, esteroide 3-cetoreductasa y esteroide 8-isomerasa, enzimas involucradas en la conversión del lanosterol a

colesterol, se han registrado como presentes en peroxisomas (Appelkvist y colaboradores, 1990). La mayor concentración de proteína 2 transportadora celular de esterol se encuentra también en peroxisomas humanos y de rata, así como niveles significativos de apolipoproteína E, un componente mayoritario de muchas clases de lipoproteínas plasmáticas. Más aún, la capacidad biosintética de colesterol se ve disminuida en cultivos de fibroblastos de piel, obtenidos de pacientes con la enfermedad de deficiencia peroxisomal, lo que sugiere que esta organela es esencial para la síntesis normal del colesterol en células fibroblásticas humanas (Stamellos y colaboradores, 1993).

El ácido mevalónico puede ser convertido en colesterol *in vitro* por peroxisomas en presencia de la fracción citosólica. La conversión de ácido mevalónico en colesterol requiere de un número de enzimas citosólicas para producir farnesil pirofosfato, el cual es luego convertido en colesterol por enzimas unidas a la membrana del RE (Stamellos y colaboradores, 1993).

Stamellos y colaboradores publican en 1993 resultados convincentes, mediante técnicas bioquímicas e inmunoquímicas, que localizan a la enzima escualeno sintetasa exclusivamente en el retículo endoplasmático.

Se han encontrado similitudes significativas en la biogénesis de los peroxisomas y glicosomas de los kinetoplátidos; y las secuencias que dirigen las proteínas a la matriz de estas organelas, están conservadas (el tripeptido c-terminal-SKL); además, ciertos receptores PEX integrales de la membrana (involucrados en el transporte de proteínas al interior de la matriz) están presentes en ambos: glicosomas y peroxisomas (de Walque, 2000). Además, Concepción y colaboradores (1998), ubicaron la enzima HGMCoA reductasa en glicosomas; por tanto, esta organela podría ser un importante reservorio de enzimas target de la ruta de síntesis de esteroides para el desarrollo de quimioterapia.

Paralelamente, *Trypanosoma cruzi* y algunas especies del género *Leishmania*, requieren esteroides específicos para su crecimiento y viabilidad celular y no pueden utilizar los esteroides disponibles en forma abundante del hospedador vertebrado, lo cual es un precedente importante, puesto que las

células hospedadoras pueden compensar el bloqueo de la síntesis endógena de colesterol a través de la dieta (Urbina, 1999).

Las drogas más comúnmente usadas para el tratamiento de enfermedades causadas por hongos y levaduras, son compuestos que interfieren con la síntesis *de novo* o función de los esteroides de las membranas de dichos patógenos; éstos son los Inhibidores de la Biosíntesis de Esteroides (IBE). Su actividad específica está basada en el agotamiento de esteroides endógenos esenciales, la acumulación de intermediarios tóxicos, o ambos. *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana* son sensibles a esta clase de inhibidores (Urbina, 1996; Urbina, 1997; Urbina, 1999; Urbina, 2000).

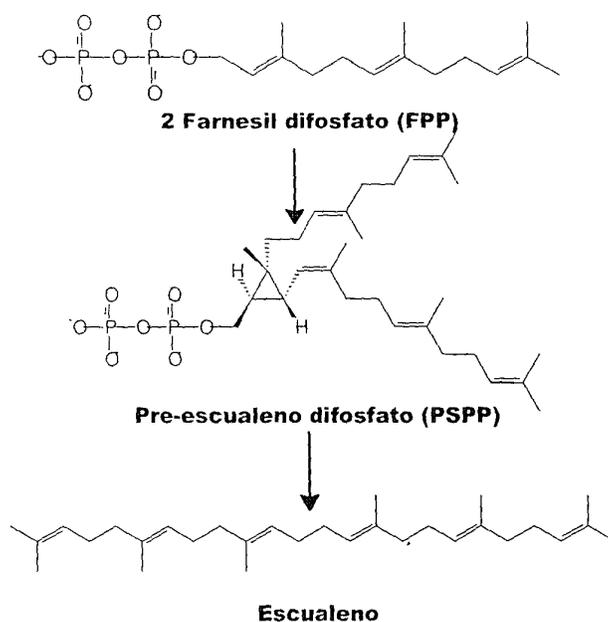
Un importante desarrollo en este campo es la demostración de que los derivados de azoles de cuarta generación (inhibidores de la C-14  $\alpha$ -demetilasa) tales como el D-0870 y Sch-56592, son capaces de inducir cura parasitológica en modelos murinos tanto en las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas, siendo los primeros compuestos en mostrar tal actividad (Urbina, 1996; Urbina, 2000). Sin embargo, algunos de estos compuestos han sido descontinuados y otros están siendo probados en variedad de modelos animales, con resultados prometedores; pero hasta ahora una quimioterapia específica para la Enfermedad de Chagas sigue siendo insuficiente.

### **1.3. Escualeno Sintetasa:**

La escualeno sintetasa (SQS, farnesil-difosfato:farnesil-difosfato farnesil-transferasa, EC 2.5.1.21) es una enzima clave en la vía biosintética de los esteroides de todas las células eucariotas por lo que representa un blanco potencialmente importante de intervención terapéutica para las drogas hipocolesterogénicas.

La escualeno sintetasa cataliza la condensación cabeza-cabeza de dos moléculas de farnesil pirofosfato (FPP) para formar el escualeno. La reacción se da en dos pasos distintos, involucrando ambos la formación de intermediarios carbocatiónicos de reacción. En la primera mitad de la reacción, dos moléculas

de FPP reaccionan para formar pre-escualeno pirofosfato (PSQPP). En la segunda mitad, el PSQPP sufre heterólisis, isomerización y reducción con NADPH para formar el escualeno (Thompson y colaboradores, 1998).



**Figura 2.** Reacción de la enzima escualeno sintetasa.

Ya que el FPP está situado en el punto final en la vía biosintética de isoprenoides, su conversión a escualeno a través de la acción de la SQS representa el primer paso comprometido en la formación del colesterol y el punto de transición de intermediarios hidrofílicos a hidrofóbicos de la vía. La conversión de FPP a escualeno representa, por tanto, un blanco atractivo para inhibir selectivamente la formación de esteroides sin interferir con la producción de poli-isoprenoides no-esteroides claves, que juegan un papel importante en la regulación del crecimiento celular y el metabolismo (Thompson y colaboradores, 1998).

En células de mamíferos, la condensación de FPP a escualeno representa una reacción enzimática que es crucial para la producción de esteroides y para la síntesis de hormonas esteroideas, vitamina D, ácidos biliares

y lipoproteínas. En adición, el FPP sirve como sustrato a varios procesos bioquímicos, incluyendo la producción de dolicol, hemo A, ubiquinonas, y la farnesilación de proteínas (Soltis y colaboradores, 1995); además de sesquiterpenoides fitoalexinas en plantas, como defensa contra el ataque de patógenos (Kribii y colaboradores, 1997).

La SQS ha sido clonada a partir de levadura, rata, ratón, humano y plantas. La proteína es de aproximadamente 46-48 kDa; está unida a la membrana del RE por su extremo carboxílico; y su extremo amino, donde está el sitio activo, se encuentra en el citosol (Devarenne y colaboradores, 1998). Esta enzima está altamente conservada a lo largo de diversas especies, con un 42% de identidad a nivel de la secuencia de aminoácidos entre levaduras y humanos (Thompson y colaboradores, 1998). Una comparación de los genes codificantes de la SQS ha revelado motivos ricos en aspartato los cuales pueden estar involucrados en la unión del motivo difosfato del sustrato fenil y se cree que estos pueden coordinar y/o facilitar la unión del FPP a través del requerimiento de ion  $Mg^{+2}$  (Devarenne y colaboradores, 1998). Esta comparación también sugiere que algunas regiones hidrofóbicas altamente conservadas pueden participar en su asociación con la membrana, localización microsomal, o la unión del NADPH (Kribii y colaboradores, 1997).

Las SQS caracterizadas a partir de levadura, hígado de ratón y de humano, tienen valores similares para el  $K_m$  del FPP, variando entre 1 y 3  $\mu M$ , y un  $K_m$  para el NADPH de 40  $\mu M$  (Soltis y colaboradores, 1995).

En el desarrollo de drogas reguladoras de los niveles de colesterol, se ha encontrado una serie de compuestos con actividad inhibitoria sobre la SQS.

Los ácidos zaragóxicos, o escualastatinas, actúan como inhibidores competitivos de la SQS con respecto al sustrato FPP e inhiben, tanto la conversión de FPP a PSQPP, como de PSQPP a escualeno (Bergstrom y colaboradores, 1995; Watson y colaboradores, 1996).

El Acido Zaragóxico A (ZGA-A) actúa inhibiendo irreversiblemente la SQS, vía un proceso similar a los inhibidores suicidas clásicos con la formación de un aducto covalente ZGA-A.SQS, que es catalíticamente incompetente

(Lindsey y Harwood, 1995).

El Acido Zaragózico C es un inhibidor competitivo del FPP en la enzima humana y tiene un  $K_i$  de 250 pM que no afecta la unión del NADPH; por tanto, se presume que los sitios de unión de ambos están separados (Soltis y colaboradores, 1995).

Los Bisfosfonatos son compuestos que contienen un enlace P-C-P y son resistentes a degradación metabólica comparado con los pirofosfatos (P-O-P) (Amin y colaboradores, 1996). Estos inhiben la resorción ósea y la mineralización y son usados para el tratamiento de diversos desordenes óseos; además, algunos que contienen nitrógeno, actúan como inhibidores de la farnesilización y geranilación de proteínas e inducen apoptosis (Amin y colaboradores, 1996; Martin y colaboradores, 1999).

La SQS de una variedad de fuentes es inhibida por los Bifosfonato CP-295679 y la benzoxazepinona CP-2944838; estos compuestos se unen al sitio activo de la SQS, asemejándose al FPP, con un grupo ácido adyacente a una larga región hidrofóbica (Thompson y colaboradores, 1998).

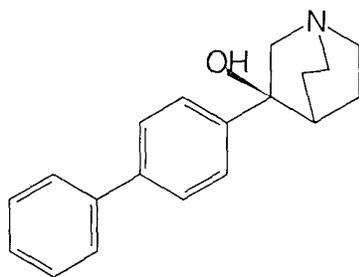
BM 21.0955 [Acido 1-Hidroxi-3-(metilfenilamino)-propilideno-1,1-bifosfonico] es un potente inhibidor de la SQS con un  $K_i$  de 2 nM (Amin y colaboradores, 1996). Isopentenil 1,1-bisfosfonatos y análogos relacionados son potentes inhibidores de la SQS microsomal de rata ( $I_{50}$ = 0.7-32nM) (Ciosek y colaboradores, 1993). La alta potencia del ibandronato como inhibidor puede depender de su habilidad para inhibir dos enzimas implicadas en la síntesis de escualeno, la farnesil pirofosfato sintetasa y la escualeno sintetasa (Martin y colaboradores, 2000).

Sin embargo, la utilidad terapéutica de los bisfosfonatos es cuestionable, ya que son moléculas altamente cargadas y, por tanto, son pobremente absorbidos cuando se ingieren por vía oral (Amin y colaboradores, 1992; Amin y colaboradores, 1996).

Una serie de inhibidores catiónicos de la SQS son las Quinuclidinas 3-sustituídas, estructuralmente muy diferentes de los Acidos Zaragózicos, y los Bisfosfonatos (Brown y colaboradores, 1996; McTaggart y colaboradores, 1996).

Las Quinuclidinas 3'-sustituidas ofrecen potencialidades farmacológicas superiores en comparación a los bisfosfonatos y ácidos zaragóxicos. que han mostrado tener pobre disponibilidad oral, presumiblemente como resultado de su estructura química di y tri-aniónica. Como cationes lipofílicos, protonados a pH fisiológico, es poco probable que simulen directamente al farnesil pirofosfato o intermediarios. A ambos pasos de la SQS, se han atribuido hipotéticamente intermediarios carbocatiónicos, y es posible que las Quinuclidinas simulen las propiedades lipofílicas y electrostáticas de uno o más de intermediarios de este tipo (McTaggart y colaboradores, 1996).

La 3-(bifenil-4-il)-quinuclidina (BPQ) y 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxiquinuclidina (BPQ-OH) causan una inhibición bifásica de la SQS con constantes de inhibición aparentes de 12nM y 15nM, respectivamente, para la fase sensible (Ward y colaboradores, 1996). Ambos, mostraron ser inhibidores de la síntesis hepática de esterol desde el mevalonato, con valores de  $IC_{50}$  de 10.6 y 7.1 mg/Kg, respectivamente, luego de administración oral a ratas (McTaggart y colaboradores, 1996).



**Figura 3.** Estructura de 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxiquinuclidina (BPQ-OH)

El desarrollo de toda esta gama de inhibidores de la SQS representa una gran ventaja, debido a que ésta es altamente conservada a lo largo de las especies, es muy probable que algunos de estos inhibidores puedan actuar sobre SQS de patógenos como *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*, inhibiendo su crecimiento por conllevar al agotamiento de sus esteroles específicos y sirviendo por ende como agentes antiparasitarios.

En este sentido, la SQS ha sido estudiada y caracterizada en una serie

de organismos, pero no en protozoarios patógenos. En este trabajo, se registra la ubicación subcelular y cinética de esta enzima y su inhibición por parte del BPQ en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*. Esta enzima es de suma importancia como posible blanco quimioterapéutico, por lo que es necesario conocer sus propiedades fisicoquímicas y poder seleccionar adecuadamente inhibidores que puedan servir como agentes quimioterapéuticos útiles para el tratamiento de las infecciones producidas por estos parásitos.

## **2. HIPÓTESIS:**

- La actividad escualeno sintetasa en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana* es potencialmente un blanco quimioterapéutico atractivo pues su inhibición en los parásitos conllevaría al agotamiento de sus esteroides específicos, en tanto que las células hospederas pueden compensar el bloqueo de la síntesis endógena de colesterol por la absorción a través de receptores superficiales (LDL).

### **3. OBJETIVOS:**

- Establecer la ubicación subcelular de la enzima escualeno sintetasa en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*, mediante el uso de técnicas de centrifugación diferencial e isopínica, tomando como referencia marcadores enzimáticos específicos de diferentes organelas.
- Determinar los parámetros cinéticos de la escualeno sintetasa de *T. cruzi*:  $K_m$ ,  $V_{max}$ , así como los parámetros cinéticos para su inhibición por BPQ-OH.
- Medir el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los parásitos, por parte de BPQ-OH y su efecto en la composición de esteroides de los mismos.

#### **4. METODOLOGIA:**

##### **4.1. Material Biológico:**

Los epimastigotes (forma proliferativa en el intestino medio del insecto vector y en medio de cultivo axénico) de la cepa EP (aislada en 1967 de un caso pediátrico agudo de Enfermedad de Chagas, por el fallecido Dr. J.W. Torrealba de la Universidad de Carabobo, Venezuela) de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, fueron cultivados en medio LIT (Liver Infusion-Tryptose), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL Cat. No. 16010-159, inactivado a 56°C por 1 hora), a 28°C, con agitación constante (120 rpm) (Camargo, 1964).

Los promastigotes de *Leishmania mexicana* (cepa NR) fueron cultivados en Medio Schneider, suplementado con suero fetal bovino (Gibco BRL Cat. No. 16010-159, inactivado a 56°C por 1 hora), a 28°C, con agitación suave.

Los amastigotes fueron cultivados en células Vero y mantenidos en Medio Mínimo Esencial (MEM, Gibco BRL Cat. N° 41500-067), suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (FBS, inactivado a 56°C durante 1 hora), e incubados bajo una atmósfera de 95% aire – 5% CO<sub>2</sub>, a 37°C. Las células fueron infectadas con 10 tripomastigotes por célula durante 2 horas y luego lavadas 3 veces con buffer fosfato salino para remover los parásitos no adheridos; luego se agregó medio fresco con y sin droga a las células que fueron incubadas durante 96 horas, con un cambio de medio a las 48 horas. La cuantificación del número de células infectadas y el número de parásitos por célula se hizo por microscopía de luz y el análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo como describen previamente Liendo y colaboradores (1998).

## 4.2. Equipos y Materiales requeridos:

### Equipos:

- Contador de radioactividad, TopCount, Microplate Scintillation & luminiscence counter, Packard.
- Centrifuga Sorvall RC-5, rotores GS-3, SS-34, y Ultracentrífuga Sorvall (OTD), rotor vertical TV860.
- Espectrofotómetro UV/visible ( $\Delta\lambda$ ), Hewlett Packard 8452A
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890, serie II equipado con un detector HP5971A de masas.
- Rotaevaporador BUCHI, modelo RE 111.

### Materiales:

- TLC plásticos (20x20cm). Sílica gel 60 F<sub>254</sub>.
- Mortero
- Carburo de silicio.
- Filtro Watman, N° 2.

### Reactivos:

- [1(n)-<sup>3</sup>H] Farnesil Pirofosfato, sal de triamonio (15.0Ci/mmol), de Amersham Pharmacia Biotech.
- Propan-2-ol.
- Cloroformo.
- Metanol.
- Benceno.

- Mezcla de inhibidores de proteasas: Pestatina 1  $\mu\text{M}$ , Antipain 0,165  $\mu\text{M}$  Leupeptin 5  $\mu\text{M}$ , TLCK 100  $\mu\text{M}$  PMSF 500  $\mu\text{M}$ , E-64 2,8  $\mu\text{M}$ , EDTA 100  $\mu\text{M}$ .
- Inhibidor: 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxi-Quinuclidina (3-bifenil-4il-1-aza-biciclo [2.2.2]-octan-3-ol; BPQ-OH) fue sintetizada y purificada como describe Brown y colaboradores (1996) en el Laboratorio de Síntesis Orgánica, Centro de Química, IVIC, Caracas-Venezuela.

#### Soluciones:

- Buffer para medir la reacción de la enzima SQS: 50 mM MOPS/NaOH, pH 7.5, 10 mM KF, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM NADPH (o sistema regenerante), 50 mM Ascorbato de sodio, 20 U/ml de Ascorbato Oxidasa.
- Solución para lavado de las microplacas de TLC: 1% de SDS en 0.2 M de Tris base (pH no ajustado).
- Buffer A para el fraccionamiento: 0.225 M de Sacarosa, 20 mM de KCl, 10 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 20 mM Tris, pH 7.2.
- Buffer B para el fraccionamiento: 0.25 M de Sacarosa, 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 25 mM Tris, pH 7.4.
- Buffer C para el fraccionamiento: 10 mM Tris, 150 mM de NaCl, pH 7.2.
- Medio de cultivo para *Trypanosoma cruzi*, Medio infusión de Hígado y Triptosa (LIT): Extracto de Levadura 5.0 g/L, NaCl 9.0 g/L, KCl 0.4 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7.5 g/L, Glucosa 4 g/L, Triptosa 15 g/L, Hemina 20 mg disueltos en 8 ml de NaOH 0.1 N, Extracto de Hígado 50 mL/L, Suero de Ternera inactivado 50 mL/L, Antibióticos (ampicilina y estreptomocina) 60 mg/L de cada uno, pH 7.3.
- Medio de cultivo para *Leishmania mexicana*, Medio Schneider: 24.5 g/L,  $\text{NaHCO}_3$  0.4 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.6 g, Suero fetal 20%, Antibióticos (penicilina y estreptomocina) 60 mg/L de cada uno, pH 6.9.
- Buffer Normal: Tris 70 mM, pH 7.2, NaCl 140 mM, KCl 11 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM.
- Buffer PBS estéril: NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L,  $\text{CaCl}_2+2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{MgSO}_4+7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.4 g/L y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g/L.

### 4.3. Ubicación Subcelular de la Escualeno Sintetasa: Fases pre-exponencial (0.4 D.O.), exponencial (0.7 D.O.) y estacionaria (1.2 D.O.)

#### 4.3.1. Centrifugación Diferencial e Isopínica:

Los ensayos de centrifugación diferencial fueron realizados de acuerdo a una modificación del procedimiento descrito por Steiger y colaboradores(1980).

Los parásitos fueron colectados del medio de cultivo por centrifugación a 3000 *xg* (20 min a 5°C), en una Sorval RC-5. La masa celular se resuspendió en buffer A y se centrifugó en las mismas condiciones descritas anteriormente. Luego se lavaron 2 veces con Buffer B a 3000 *xg* por 20 minutos a 5°C. Del segundo lavado, los parásitos se depositaron en un mortero previamente frío, y se añadió Carburo de Silicio en una proporción 1:1 respecto al peso del pellet de parásitos y una pequeña cantidad de Buffer B con un cocktail de inhibidores de proteasas. Los parásitos fueron rotos por abrasión, y el grado de ruptura se siguió por microscopía de luz, hasta que fue aproximadamente el 90%. La pasta resultante se resuspendió en buffer B con inhibidores, se dejó sedimentar y se centrifugó a 300 *xg* por 3 minutos en una centrífuga Sorval RC-5, usando un rotor SS-34 para eliminar el Carburo de Silicio. El sobrenadante resultante de esta centrifugación (**Homogenato**), se sometió a dos centrifugaciones sucesivas: a 1000 *xg* por 5 minutos para sedimentar la **Fracción Nuclear (FN)**, y a 3000 *xg* por 10 minutos, para obtener la **Fracción Granular Gruesa (FGG)**. Se obtuvo una **Fracción Rica en Glicosomas (FRG)**, luego de centrifugar a 33000 *xg* por 15 min a 5°C, el sobrenadante post-FGG. El sobrenadante post-FRG se ultracentrifugó a 105000 *xg* por 1 hora, en una ultracentrifuga Sorval OTD, usando un rotor T865 de ángulo fijo con el fin de separar la **Fracción Microsomal (FM, pellet)**, de la **Fracción Citosólica (FC, sobrenadante)**.

La **Fración Rica en Glicosomas** se resuspendió en un volumen mínimo de buffer B con inhibidores y se cargó en un gradiente lineal de Sacarosa (0.3-2,5M) previamente frío. Seguidamente, se ultracentrifugó a 170000  $xg$  por 2 horas a 5°C en una ultracentrifuga Sorvall (OTD), usando un rotor vertical TV860 y un programa de aceleración y desaceleración lenta. Se extrajo la banda glicosomal (1,23gr/cm<sup>3</sup>), se diluyó cuidadosamente 4 veces en Buffer B con inhibidores, y se centrifugó a 33000  $xg$  por 15 minutos a 5°C, para obtener los **Glicosomas Purificados (GP)**. Estos se resuspendieron en un volumen mínimo de Buffer B con inhibidores. Se procedió a determinar la latencia de los glicosomas, midiendo la actividad de la enzima marcadora glicosomal Hexoquinasa antes y después de la adición de Tritón X-100 (a una concentración final de 0.1%) y NaCl 150 mM (Concepción y colaboradores, 1999). La latencia de esta organela siempre fue mayor al 90% para poder llevar a cabo los ensayos de ubicación de la SQS.

Una alícuota del **Homogenato**, previamente guardada, fue cargada en un gradiente lineal de Sacarosa y ultracentrifugada a 170000  $xg$  por 2 horas. Luego el gradiente fue fraccionado en alícuotas de 2 ml, tomándolas desde el fondo del tubo (Concepción y colaboradores, 1998).

#### **4.3.2. Determinación de la concentración de proteínas:**

Las proteínas de las muestras experimentales fueron precipitadas con Deoxicolato (DOC) al 10% v/v (a partir de un stock al 0.15% p/v), incubando por 10 minutos. Seguidamente se agregó Acido Tricloroacético (TCA) al 10% (a partir de un stock saturado), colocándose en hielo por 15 minutos. Luego las muestras fueron centrifugadas en una Microcentrifuga Eppendorf, 5415C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet se resuspendió en agua destilada para luego homogeneizar la muestra. Este procedimiento se hace para eliminar compuestos interferentes.

La concentración de proteínas de estas muestras precipitadas y homogeneizadas fue determinada por el método de Lowry y colaboradores (1951), utilizando como patrón una curva de calibración con albúmina bovina.

#### **4.3.3. Ensayos enzimáticos para los marcadores de las diferentes organelas:**

Cada una de las enzimas marcadoras se midió en todas las fracciones de la centrifugación diferencial e isopícnica, mediante el uso de un Espectrofotómetro UV/visible ( $\Delta\lambda$ ), Hewlett Packard 8452A.

Las actividades hexoquinasa (HK; EC 2.7.1.1), alanina-aminotransferasa (ALAT; EC2.6.1.2), fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2), fosfatasa alcalina y malato deshidrogenasa (MDH; EC 1.1.1.37) fueron determinadas de acuerdo a Bergmeyer (1983). La fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK; EC 4.1.1.31) de acuerdo a Urbina (1987). Succinato deshidrogenasa (SDH; EC 1.3.5.1) fue determinada como describe Köler y Bachmann (1980). 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa; EC 1.1.1.34) como lo describen Concepción y colaboradores (1998).

#### Determinación de la Latencia de los Glicosoma:

La latencia del glicosoma es un parámetro que permite inferir sobre la integridad de la organela aislada. En ausencia de detergentes que solubilicen la membrana, la actividad de las enzimas glicolíticas contenidas en la matriz de la organela es baja, ya que la membrana evita que los cofactores, sustratos y sistemas acoplantes lleguen a dichas enzimas. Cuando ésta se solubiliza con Tritón X-100 (0,1% v/v), en presencia de 150 mM de NaCl, el acceso de los

sistemas acoplantes a las enzimas del glicosoma es libre y la actividad de estas enzimas aumenta significativamente.

Se midió la actividad inicial de la enzima hexoquinasa (HK) en las siguientes condiciones: Buffer Tris 20 mM, pH 7.2, 0.225 M de Sacarosa, 20 mM de KCl, 10 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , acoplado la reacción a la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y midiendo la aparición de NADPH a 340 nm. Para la actividad final, se añadió 0,1% v/v Tritón X-100, y 150 mM NaCl.

La latencia fue determinada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Latencia} = \frac{\text{Actividad final} - \text{Actividad inicial}}{\text{Actividad final}} \times 100\%$$

#### **A. Escualeno Sintetasa:**

El ensayo se hizo a un volumen total de 100  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción contenía: 50 mM MOPS/NaOH, pH 7.5, 10 mM KF, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM NADPH, 4 mM de Glucosa-6-fosfato, 25  $\mu\text{M}$  de  $[1(n)\text{-}^3\text{H}] \text{FPP}$  (5 $\mu\text{Ci}$ /ensayo), 50 mM de ascorbato, 20 unidades/ml de ascorbato oxidasa, 2 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 100  $\mu\text{g}$  de proteínas de cada fracción. Luego de incubar durante 2 horas a 28  $^\circ\text{C}$ , se añadió 100  $\mu\text{L}$  de Propan-2-ol para detener la reacción.

Para la estimación cuantitativa de la producción de escualeno, se utilizaron dos métodos:

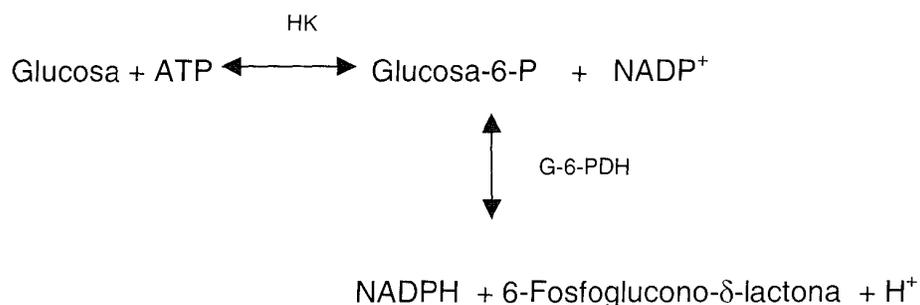
a) Extracción con Hexano:

A la mezcla de reacción se agregó 1 ml de hexano, para extraer la fracción lipídica. Se desechó la fase acuosa y se realizó la extracción con hexano 2 veces más. Luego, la muestra se dejó evaporar en una campana hasta un volumen mínimo. La radiactividad extraída en el hexano se cuantificó en un Top-Count, agregando 1 ml de Líquido de centelleo, Microscint™-40.

b) Spot-Wash:

Se colocó 25  $\mu$ L de la mezcla de reacción en placas de Sílica Gel TLC (20 x 20 cm), divididas en cuadritos de 2 x 2 cm. Se dejó secar, y éstas se lavaron dos veces con 1% de SDS en 0.2M de Tris base (pH no ajustado). Cada lavado se hizo en bandejas poco profundas por 15 min con agitación constante. Luego de estar secas, los cuadros se cortaron y se cuantificó la producción de escualeno radioactivo en un Top-Count, agregando 1 ml de Líquido de centelleo (Tait, 1992).

**B. Hexoquinasa (marcador del glicosoma):** la actividad de esta enzima se midió de manera indirecta, acoplando la reacción con la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y, por tanto, midiendo la aparición de NADPH a 340 nm. La reacción llevada a cabo fue la siguiente:





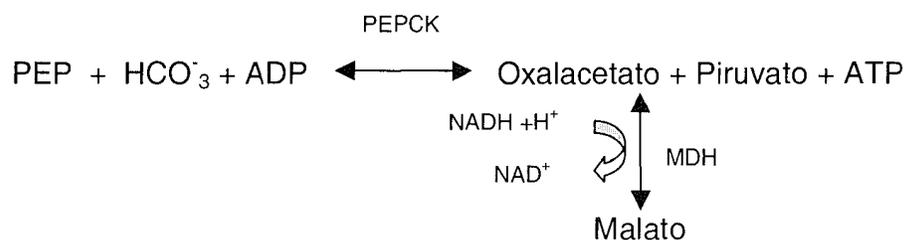
Mezcla de reacción: Buffer Imidazol 0.09 M, pH 8, 3.6m M MgCl<sub>2</sub>, 0.36 mM NAD<sup>+</sup>, Isocitrato 6 mM y 40 μL de muestra.

**E. Malato deshidrogenasa (marcador de citosol y mitocondria en *T. cruzi*):** se midió directamente la desaparición de NADH a 340 nm.



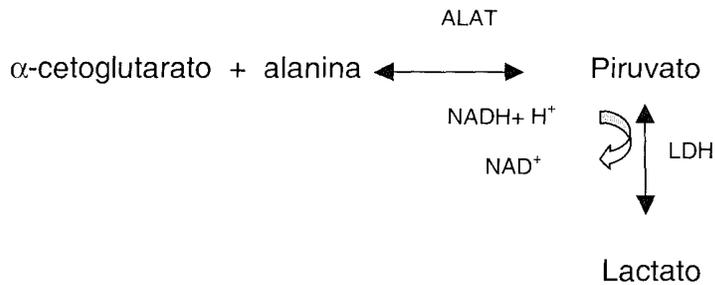
Mezcla de reacción: Buffer Tris-HCl 0.28 M, pH 7.7, oxalacetato 1 mM, NADH 0.24 mM, y 30μL de muestra.

**F. Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (marcador del glicosoma):** esta enzima se midió indirectamente, acoplando su actividad a la de la malato deshidrogenasa, y siguiendo la desaparición de NADH.



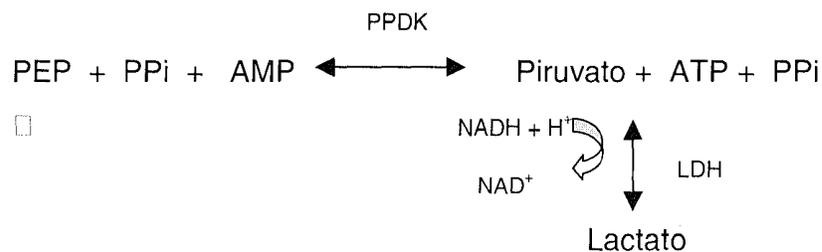
Mezcla de reacción: Buffer Fosfato 40 mM, pH 7, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM MnCl<sub>2</sub>, PEP 0.4 mM, ADP 4.86 mM, NADH 0.24 mM, NaHCO<sub>3</sub> 10 mM, 1 U de malato deshidrogenasa y 50 μL de muestra.

**G. Alanin-amino transferasa (marcador de mitocondria y citosol):** esta enzima se acopló a la lactato deshidrogenasa y se midió la desaparición de NADH a 340 nm.



Mezcla de reacción: Buffer Hepes 86 mM, pH 7.6, 125 mM NaCl, 4.64 mM KCl, 1.55 mM CaCl<sub>2</sub>, 6.88 mM MgSO<sub>2</sub>, alanina 9 mM, α-cetoglutarato 9 mM, 1 U de lactato deshidrogenasa, NADH 0.24 mM y 50 μL de muestra.

**H. Piruvato fosfato diquinasa (marcador del glicosoma):** esta enzima se acopló a la lactato deshidrogenasa y se midió la desaparición de NADH a 340 nm.



Mezcla de reacción: Buffer Tris-HCl 0.21 M, pH 7.7, 2.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U de lactato deshidrogenasa, NADH 0.24 mM, PPi 4 mM, AMP 0.6 mM, PEP 0.4 mM, y 50 μL de muestra.

#### 4.3.4. Separación de Fase con Tritón X-114:

Las fracciones donde se detectó la mayor actividad de la enzima SQS, se mezclaron con 4 volúmenes de Buffer C, se agregó Tritón X-114 a una concentración final del 2% v/v y se mantuvo a -20°C durante toda la noche.

Las muestras fueron descongeladas y colocadas a 30°C por 10 minutos. Una vez que se separaron las fases, se centrifugó a 300 *xg* por 4 minutos usando una Sorvall RC-3 y un rotor HL-8. Las fases se colocaron en tubos independientes. La **Fase Rica en Detergente** (FRD) se llevó nuevamente al volumen inicial de Buffer C y 0.1% de Tritón X-114. A la **Fase Soluble** (FS) se le agregó Tritón X-114 hasta una concentración final del 2% v/v. Todas las fases se incubaron a 0°C por 10 minutos y seguidamente a 30°C por 10 minutos. Una vez que se dio la separación de fases, se centrifugaron nuevamente a 300 *xg* por 4 minutos (Bordier, 1981).

Lo anteriormente descrito se repitió 2 veces. Una pequeña alícuota de cada una de estas fracciones **FRD** y **FS**, se precipitó con DOC-TCA, como se describió anteriormente, y se determinó la concentración de proteínas por Lowry, para realizar luego los ensayos de actividad SQS.

#### **4.4. Cinética e Inhibición de la actividad Escualeno Sintetasa:**

Las reacciones se hicieron bajo las condiciones señaladas anteriormente para la determinación de la actividad escualeno sintetasa.

##### **4.4.1. Estandarización de las condiciones de reacción:**

- Curva de tiempo: se llevaron a cabo los ensayos de SQS a diferentes tiempos para determinar el tiempo óptimo en el que la producción de escualeno fuese lineal. Los tiempos ensayados fueron: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, y 60min. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 25  $\mu$ M de FPP, 1mM de NADPH, 150 $\mu$ g de proteínas y se cuantificó la producción de escualeno radiactivo mediante el método de Spot-Wash descrito anteriormente.

- Curva de concentración de proteínas: los ensayos de SQS se llevaron a cabo utilizando diferentes concentraciones de proteínas para determinar el rango en el que la producción de escualeno fuese lineal. Las concentraciones de proteínas probadas fueron las siguientes: 5, 10, 20, 30 y 50µg. Las condiciones de reacción fueron: 25 µM de FPP, 1 mM de NADPH, y el tiempo óptimo determinado en el ensayo anterior.

#### 4.4.2. Determinación de parámetros cinéticos de la enzima escualeno sintetasa:

En todos los ensayos se usaron 150µg de proteínas, y la duración de la reacción fue de 30 min y 28°C. Se probaron concentraciones de FPP entre 0.5 y 20µM, y de NADPH entre 5 y 200µM. Cada una de las concentraciones de FPP se probó independientemente con cada una de las 6 concentraciones de NADPH. Se graficaron los inversos de las velocidades iniciales vs los inversos de las concentraciones de los sustratos (gráficas de Lineweaver-Burk), para la determinación de los respectivos  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ . Estas determinaciones se realizaron tanto para los ***Glicosomas Purificados*** como para la ***Fracción Microsomal*** (Sasiak y Rilling, 1988; Mookhtiar y colaboradores, 1994; Soltis y colaboradores, 1995; Amin y colaboradores, 1996; Ward y colaboradores, 1996).

#### 4.4.3. Inhibición de SQS con BPQ-OH:

Los ensayos de inhibición con BPQ-OH se realizaron tanto en la ***Fracción Microsomal*** como de ***Glicosomas Purificados***.

- Determinación del  $K_i$  para la BPQ-OH: los ensayos se realizaron variando las concentraciones de FPP (utilizando un rango de concentraciones entre: 0.5 y 12µM), para diferentes concentraciones de BPQ-OH entre 0 y

30nM; y una concentración fija y saturante de 1mM de NADPH. Se graficaron los inversos de las velocidades iniciales *versus* los inversos de las concentraciones de FPP, para cada concentración de BPQ-OH (Ward y colaboradores, 1996).

- Curva dosis-respuesta ( $IC_{50}$ ): este ensayo se llevó a cabo incubando previamente la enzima (150  $\mu$ g de proteínas) con BPQ-OH durante 15 minutos. La concentración de FPP para la **Fracción Microsomal** fue de 25  $\mu$ M (aproximadamente 10 veces el  $K_m$ : 2.35  $\mu$ M), mientras que para los **Glicosomas Purificados** fue de 18  $\mu$ M (aproximadamente 6 veces el  $K_m$ : 2.82  $\mu$ M). Se utilizaron concentraciones de BPQ-OH entre 0 y 6000 nM y 5 mM de NADPH. Se graficó la producción de escualeno ( $\mu$ mol/ $\mu$ g de proteína/min) vs la concentración de BPQ-OH para determinar el  $IC_{50}$ , y el tipo de inhibición que produce (Ward y colaboradores, 1996).

#### **4.5. Inhibición de la proliferación de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana* por BPQ-OH sobre células intactas *in vitro*.**

##### **4.5.1. Efecto inhibitorio de BPQ-OH sobre el crecimiento de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, y promastigotes de *Leishmania mexicana*.**

El estudio del efecto de los inhibidores se hizo en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y promastigotes de *Leishmania mexicana*. Para ello, se siguió el curso temporal del crecimiento celular por cambios en la absorbancia a 600nm. La población celular se calculó a partir de una curva de calibración de Abs vs N° de células/ml.

Los cultivos en paralelo [10 ml de medio de cultivo LIT (*T. cruzi*), y medio Schneider (*L. mexicana*)], fueron inoculados inicialmente con  $2 \times 10^6$  células/ml y  $3.5 \times 10^6$  cél/ml, respectivamente. Los cultivos de *T. cruzi* se mantuvieron a 28°C,

en agitación, mientras que los de *L. mexicana* se mantuvieron a 28°C, sin agitación. Al alcanzar una densidad de células de  $6 \times 10^6$ /ml para *T. cruzi*, y de  $5 \times 10^6$  para *L. mexicana*. (fase exponencial de crecimiento), se agregó, en condiciones estériles, BPQ-OH.

La droga se preparó en solución de dimetilsulfoxido (DMSO). Por diluciones seriadas, se prepararon una serie de soluciones stocks para abarcar desde 0 a 10  $\mu$ M (concentraciones finales en el cultivo) para *T. cruzi*, y de 0 a 30  $\mu$ M para *L. mexicana*. Para evitar los efectos del DMSO, se prepararon las soluciones concentradas 100X para obtener un 1% de DMSO final en los cultivos.

Los controles de este experimento fueron cultivos a los que se agregó el mismo volumen de DMSO (100  $\mu$ L) utilizado para el inhibidor y cultivos sin DMSO, ni droga (posible efecto del DMSO solo).

Se siguió el curso temporal de los cambios de absorbancia, con mediciones cada 24 horas. Adicionalmente se hicieron observaciones al microscópio de los posibles cambios morfológicos, inducidos por los cambios en los esteroides de membrana. Para el efecto tripanocida, se notó la lisis celular, evidenciada por una disminución de la absorbancia (Vivas, 1996). El ensayo de cada una de las concentraciones de BPQ-OH fue hecho por triplicado.

Los valores de  $IC_{50}$  se calcularon a partir de un análisis de regresión no lineal en GraFit. Se hizo de dos maneras independientes: a) graficando los porcentajes de crecimiento relativo vs la concentración de BPQ-OH y b) graficando la tasa de crecimiento relativa vs la concentración de la droga.

Donde:

$$\% \text{ crecimiento} = \frac{N^{\circ} \text{ células/ml final} - N^{\circ} \text{ células/ml inicial (después agreg. BPQ-OH)}}{N^{\circ} \text{ células/ml inicial}} \times 100$$

$$\% \text{ crecimiento relativo} = \frac{\% \text{ crecimiento para una concentración de BPQ-OH}}{\% \text{ crecimiento para el control}} \times 100$$

$$\text{Tasa de crecimiento} = \frac{N^{\circ} \text{ células/ml final} - N^{\circ} \text{ células/ml (48 horas antes de detener el ensayo)}}{48 \text{ horas}} \times 100$$

$$\text{Tasa de crecimiento relativo} = \frac{\text{Tasa de crecimiento para una concentración de BPQ-OH}}{\text{Tasa de crecimiento para el control}} \times 100$$

También se realizó de manera independiente, un ensayo en el que se midió diariamente, conjuntamente con la D.O., la actividad esterasa (como manera de cuantificar la viabilidad celular) y se contó el número de células/ml por el método de Pizzi-Brener. Para este ensayo se probaron concentraciones de BPQ-OH entre 0 y 150  $\mu\text{M}$ .

La actividad Esterasa se midió mediante el siguiente ensayo (estandarizado para 5 millones de células): se agregó un volumen de cultivo que correspondió a una densidad celular aproximada de  $5 \times 10^6$  cel/ml, se completó hasta 1 ml con tampón Normal. Para dar inicio a la reacción se agregó 9  $\mu\text{L}$  de un stock de Para-Nitrofenil Fosfato (12 mg/1 ml de metanol al 100%). El blanco sólo contenía 1ml de tampón Normal y 9  $\mu\text{L}$  del stock de PNPA, para medir la tasa de descomposición espontánea de este compuesto en Para-Nitrofenol. Luego se calculó la actividad enzimática. Se hizo una curva patrón de actividad enzimática vs número de células/ml, para cultivos de *T. cruzi* en ausencia de la droga.

Cada uno de estos parámetros (D.O. y actividad esterasa) se transformó en número de células/ml y se graficó vs el tiempo.

#### **4.5.2. Efecto de BPQ-OH sobre la síntesis *de novo* de esteroides en epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. mexicana*:**

Los cultivos de *Trypanosoma cruzi* se iniciaron con una densidad celular promedio de  $2 \times 10^6$  células/ml, fueron incubados por 48 horas, momento en el cual se le agregó BPQ-OH ( $6 \times 10^6$  cel/ml) y se incubaron por 192 horas más.

Los cultivos de *Leishmania mexicana* se iniciaron con una densidad celular promedio de  $3.5 \times 10^6$  células/ml. La droga se agregó cuando la densidad celular promedio fue de  $5 \times 10^6$  cel/ml, y se incubaron por 96 horas más.

Las células se cosecharon por centrifugación (1000xg por 15 min, 4°C), y se lavaron 2 veces con buffer "Normal" (Tris 70 mM, pH 7.2, NaCl 140 mM, KCl 11 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM). El segundo lavado se efectuó en tubos corex. El sedimento celular de la segunda centrifugación rindió el material de partida "masa de parásitos". Los lípidos totales se extrajeron con 30 ml de cloroformo/metanol 2:1 durante 24 horas (mínimo) a 4°C; la mezcla de extracción se filtró en un papel de filtro Whatman #1 para separar el material insoluble. Esta fracción rindió los lípidos totales en cloroformo/metanol. Para su ulterior procesamiento, este material se secó en un rotaevaporador BUCHI, modelo RE111, añadiendo en varias oportunidades cloroformo/metanol 2:1, para evitar la precipitación del material lipídico. Una vez evaporado a sequedad, se resuspendió en 1 ml de cloroformo, obteniéndose los lípidos totales en cloroformo (LT/cloroformo).

Para separar los Lípidos Neutros de los Lípidos Polares se siguió el procedimiento descrito por Hirsch y Ahrens en 1958 (adaptado en el Laboratorio de Química Biológica del IVIC), con una cromatografía en columna de ácido silícico. Se agregaron 4 volúmenes de cloroformo a la columna, y de éste lavado se obtuvieron los lípidos neutros. Esta fracción se rotoevaporó a sequedad y se resuspendió en un volumen mínimo de cloroformo. Seguidamente se filtró con papel de filtro Watman #1, para eliminar restos de sílica que pudieran quedar.

La fracción de lípidos neutros fue analizada por cromatografía gas-líquida convencional (separación isotérmica en una columna de vidrio 4-m empacada con 3% OV-1 sobre una malla Chromosob 100/200 , con nitrógeno como gas de corrida a 24 ml/min, y detección de flama de ionización en un cromatógrafo de gases Varian 3700). Para el análisis cuantitativo y la asignación de estructuras los lípidos neutros fueron separados en una columna capilar de alta resolución ( 25 m x 0.20 mm Columna Ultra-2, 5% de fenil-metil-silicona, 0.33 µm de espesor de la película) en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 Plus equipado con un detector de masa sensible HP5973A. Los lípidos fueron inyectados en cloroformo ; la columna se mantuvo a 50°C por 1 min y luego se incrementó la temperatura a 270°C a una velocidad de 25°C/min y finalmente a

300°C a una velocidad de 1°C/min. El gas de corrida (He) fluyó a una velocidad constante de 0.5 ml/min. La temperatura del inyector fue de 250°C y el detector se mantuvo a 280°C (Urbina y colaboradores,1996; Liendo y colaboradores,1998; Urbina y colaboradores, 1998; Liendo y colaboradores,1999).

#### **4.5.3. Efecto de BPQ-OH sobre la proliferación de amastigotes de *T. cruzi*:**

Los amastigotes fueron cultivados en células Vero y mantenidos en Medio Mínimo Esencial (MEM) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) inactivado a 56°C durante 1 hora, e incubados bajo una atmósfera de 95% aire-5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células fueron infectadas durante 2 horas con tripomastigotes provenientes de cultivos celulares en una proporción 10:1 tripomastigotes por célula. Una vez infectadas, las células se lavaron 3 veces con Buffer Fosfato Salino (PBS) para remover los parásitos no adheridos. Seguidamente se agregó medio fresco suplementado con 2% de FBS y se añadió la BPQ-OH en las siguientes concentraciones 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, y 100µM. Para este experimento se hicieron controles con ketoconazol a una concentración final de 1µM (control positivo, puesto que esta droga tiene efecto sobre la proliferación de los amastigotes a esta concentración), y sin la adición de ninguna droga (control negativo, para tener un patron del nivel de infección de las células Vero en ausencia de drogas). Las células se incubaron por 96 horas con la droga, con un cambio de medio y droga a las 48 horas. Las láminas con las células se fijaron con PBS y 2.5% de glutaraldehido y, luego fueron teñidas con solución May-Grunwald y tinción Giemsa. La cuantificación del número de células infectadas y número de parásitos por células, se realizó mediante el uso de microscopía de luz (Martín y colaboradores, 2000; Lira y colaboradores, 2001).

La monocapa de células Vero debe ser confluyente al momento de hacer la infección; de lo contrario, puede verse afectada por este proceso y la aplicación de la droga.

Los cálculos de IC<sub>50</sub> para BPQ-OH en amastigotes de *T. cruzi* se hicieron a través de un análisis de regresión no lineal en GraFit, graficando: a) el porcentaje relativo de amastigotes/células infectadas vs la concentración de BPQ-OH, y b) el porcentaje relativo de células infectadas/campo vs la concentración de BPQ-OH.

Donde:

$$\% \text{ relativo de amastigotes/célula} = \frac{\% \text{ amastigotes/célula para una concentración de BPQ-OH}}{\% \text{ amastigotes/célula para el control}} \times 100$$

$$\% \text{ relativo de células infectadas/campo} = \frac{\% \text{ células infectadas para una concentración de BPQ-OH}}{\% \text{ células infectadas para el control}} \times 100$$

## **5. RESULTADOS:**

### **5.1. Ubicación subcelular de la Escualeno Sintetasa en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*:**

El homogenato obtenido a partir de la ruptura de los epimastigotes (*T. cruzi*) y promastigotes (*L. mexicana*) se separó en 5 fracciones mediante centrifugación diferencial: Fracción Nuclear (**FN**), Fracción Granular Gruesa (**FGG**), Fracción Rica en Glicosomas (**FRG**), Fracción Microsómica (**FM**) y Fracción Citosólica (**FC**). Se obtuvo una fracción de Glicosomas Purificados (**GP**), luego de llevar a cabo con la **FRG** una centrifugación isopícnica en un gradiente lineal de densidad de sacarosa (0.3 a 2,5M).

Una fracción del homogenato se centrifugó en un gradiente lineal de densidad de sacarosa (0.3 a 2,5M) y se colectaron un total de 15 –18 fracciones desde el fondo del tubo.

El promedio de las actividades específicas relativas se graficó vs las proteínas acumuladas de acuerdo a Taylor y Gutteridge (1987).

La distribución de las enzimas marcadoras para cada una de dichas fracciones obtenidas a partir de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (fases pre-exponencial, exponencial y estacionaria), se muestra en las figuras 4 a 9.

Las figuras 10 y 11 muestran los perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de promastigotes de *Leishmania mexicana* en fase exponencial,

para las diferentes fracciones obtenidas a través de centrifugación isopícnica y diferencial, respectivamente.

La distribución de las actividades enzimáticas relativas y las proteínas en cada una de las fracciones, tanto de la centrifugación diferencial como isopícnica, se encontró dentro de los límites ya observados anteriormente.

En las figuras anteriores se puede observar que la mayoría de la actividad enzimática recuperada de las enzimas HK (ATP), HK (PPi) está asociada a la fracción **Glicosomas Purificados (GP)**, en las centrifugaciones diferenciales; y a una densidad de  $1.23\text{gr/cm}^3$ , en las centrifugaciones isopínicas, como era de esperarse puesto que éstas son marcadores enzimáticos de dicha organela.

La enzima PEPCCK presentó una distribución dual, estando presente en glicosomas y mitocondria, en epimastigotes de *T. cruzi* en fase pre-exponencial y estacionaria, y en promastigotes de *L. mexicana* en fase exponencial. En fase exponencial de *T. cruzi* mostró su ubicación exclusiva en el glicosoma que coincide con lo publicado por Mottran y colaboradores (1985) y por Hart y Opperdoes (1984)..

Los marcadores mitocondriales IDH y SDH presentaron una distribución muy similar en los fraccionamientos realizados en las diferentes fases de crecimiento de *T. cruzi* y *L. mexicana*. La actividad de estas enzimas está asociada casi exclusivamente a la **FGG** (en las centrifugaciones diferenciales) y en las centrifugaciones isopínicas en una región de densidad entre 1,08 y 1,10  $\text{g/cm}^3$ , correspondiente a partículas sub-mitocondriales (Concepción y colaboradores, 1998).

La enzima PPDK presentó una distribución dual tanto en la centrifugación diferencial e isopícnica de *T. cruzi* y *L. mexicana*, con picos en la región correspondiente a los marcadores glicosómicos y mitocondriales; aunque fueron mayores los picos glicosómicos (excepto en la centrifugación isopícnica de *T. cruzi* en fase pre-exponencial, donde fue mayor el pico mitocondrial).

La enzima alanina-aminotransferasa en las centrifugaciones diferenciales de *T. cruzi* en diferentes fases de crecimiento, presenta picos en la **FC**, y la **FGG**, siendo mayores aquellos de la **FC**. En las centrifugaciones isopínicas, los

picos de mayor actividad ALAT coinciden con los picos de las enzimas marcadoras mitocondriales.

La enzima malato deshidrogenasa presentó una distribución dual, que coincide con lo publicado anteriormente para estos protozoarios tanto en glicosomas como mitocondria (Concepción y colaboradores,1999). En el fraccionamiento de epimastigotes de *T. cruzi* en fase estacionaria, el pico correspondiente a los glicosomas es de mayor importancia y, de hecho, en la centrifugación isopícnica la actividad asociada a la zona mitocondrial es prácticamente nula.

En las centrifugaciones diferenciales la máxima actividad glucosa-6-fosfatasa se encuentra en la **FM**. Sin embargo, la actividad asociada a los glicosomas es alta en *T. cruzi* para las fases exponencial y pre-exponencial, representando un promedio de 25% de la actividad total, y sólo un 9% de la actividad en fase estacionaria. Este pico glicosómico no está presente en *L. mexicana*. En las centrifugaciones isopínicas realizadas en *T. cruzi*, la actividad glucosa-6-fosfatasa se encuentra a lo largo de todo el gradiente con una zona de mayor actividad entre los 1.10 y 1.15gr/cm<sup>3</sup> de densidad. En *L. mexicana* se observa un pico de actividad en una región muy cercana a los marcadores glicosómicos.

La enzima esterasa en la centrifugación diferencial presenta la mayor actividad asociada a la **FM** y se observa un pico pequeño en la **FGG**, que representa en promedio el 15% de la actividad en las fases exponencial y pre-exponencial de *T. cruzi*. Muestra 2 picos en la centrifugación isopícnica, uno que coincide con la región de mayor actividad de la glucosa-6-fosfatasa y otro que coincide con los marcadores mitocondriales.

La fosfatasa alcalina es una enzima marcadora de la membrana plasmática. Presenta un patrón de ubicación (en las centrifugaciones diferenciales de *T. cruzi* y *L. mexicana*) muy similar al de la glucosa-6-fosfatasa, salvo que prácticamente no hay actividad asociada al glicosoma. Para la centrifugación isopícnica muestra 2 patrones de distribución en *T. cruzi*. En fase exponencial, su ubicación es idéntica a la de la esterasa con 2 picos, uno

microsomal y otro mitocondrial. Para las fases pre-exponencial y estacionaria, se encuentra prácticamente a lo largo de todo el gradiente; y en *L. mexicana* muestra un pico de actividad alta a una densidad entre 1.12 y 1.19gr/cm<sup>3</sup>.

En la centrifugación diferencial, la mayor actividad de la fosfatasa ácida está asociada a la **FGG**, como se esperaba. Este marcador lisosomal, sólo se midió en *L. mexicana*, donde se muestra un pico a una densidad entre 1.12 y 1.19gr/cm<sup>3</sup>, en la centrifugación isopícnica.

La PYK, marcador citosólico, en la centrifugación diferencial muestra toda la actividad asociada a la **FC** y en el gradiente está ubicada al tope del gradiente, entre 1.05 y 1.12gr/cm<sup>3</sup>. Esta enzima sólo se midió en *L. mexicana*.

HMG-CoA reductasa presenta una distribución dual, con picos que coinciden con los marcadores glicosomales y microsomales/mitocondriales, en fase pre-exponencial y estacionaria. En fase exponencial, sólo está presente en glicosomas. Esta enzima ha sido previamente ubicada en glicosomas (Concepción, 1998. Su ubicación en microsomas es una novedad en *T. cruzi*, lo que coincide con lo publicado para células de mamíferos (Krisans, 1992). González-Packanoska y colaboradores han reportado la actividad de esta enzima en la mitocondria; sin embargo, en este trabajo no se corrobora esta hipótesis.

(S)-adenosil-L-metionina esterol transferasa presenta una distribución dual en todas las fases de crecimiento de *T. cruzi*, coincidiendo con los marcadores de microsomas/mitocondrias y glicosomas.

La escualeno sintetasa presenta una distribución dual en todos los estadios de crecimiento de *T. cruzi*, en la **FRG** y **FM** en las centrifugaciones diferenciales. La enzima de epimastigotes de *T. cruzi* fue separada en 2 fracciones bien definidas luego de la centrifugación isopícnica. Un componente formado por una banda de densidad correspondiente a la de los glicosomas (1.23 g/cm<sup>3</sup>) que co-purifica con los marcadores glicosómicos clásicos como HK (tanto la dependiente de ATP como PPI), PEPCK y PPK. Otra banda asociada a vesículas mitocondriales/microsomales, donde se solapan los marcadores

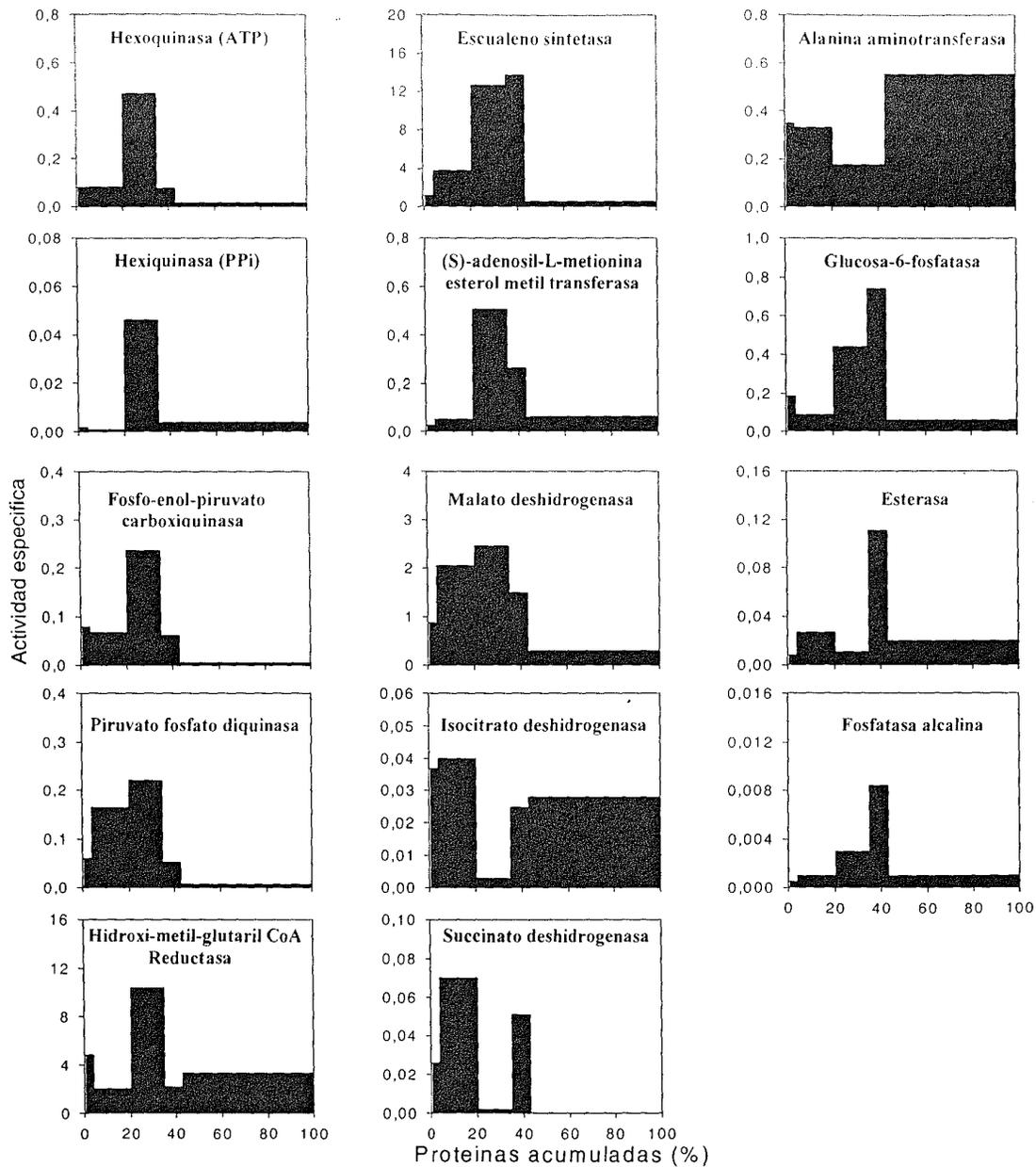
mitocondriales (IDH y SDH) y del retículo endoplasmático (glucosa-6-fosfatasa). Los mismos resultados fueron obtenidos con promastigotes de *L. mexicana*.

### 5.1.1 Asociación de SQS a membranas:

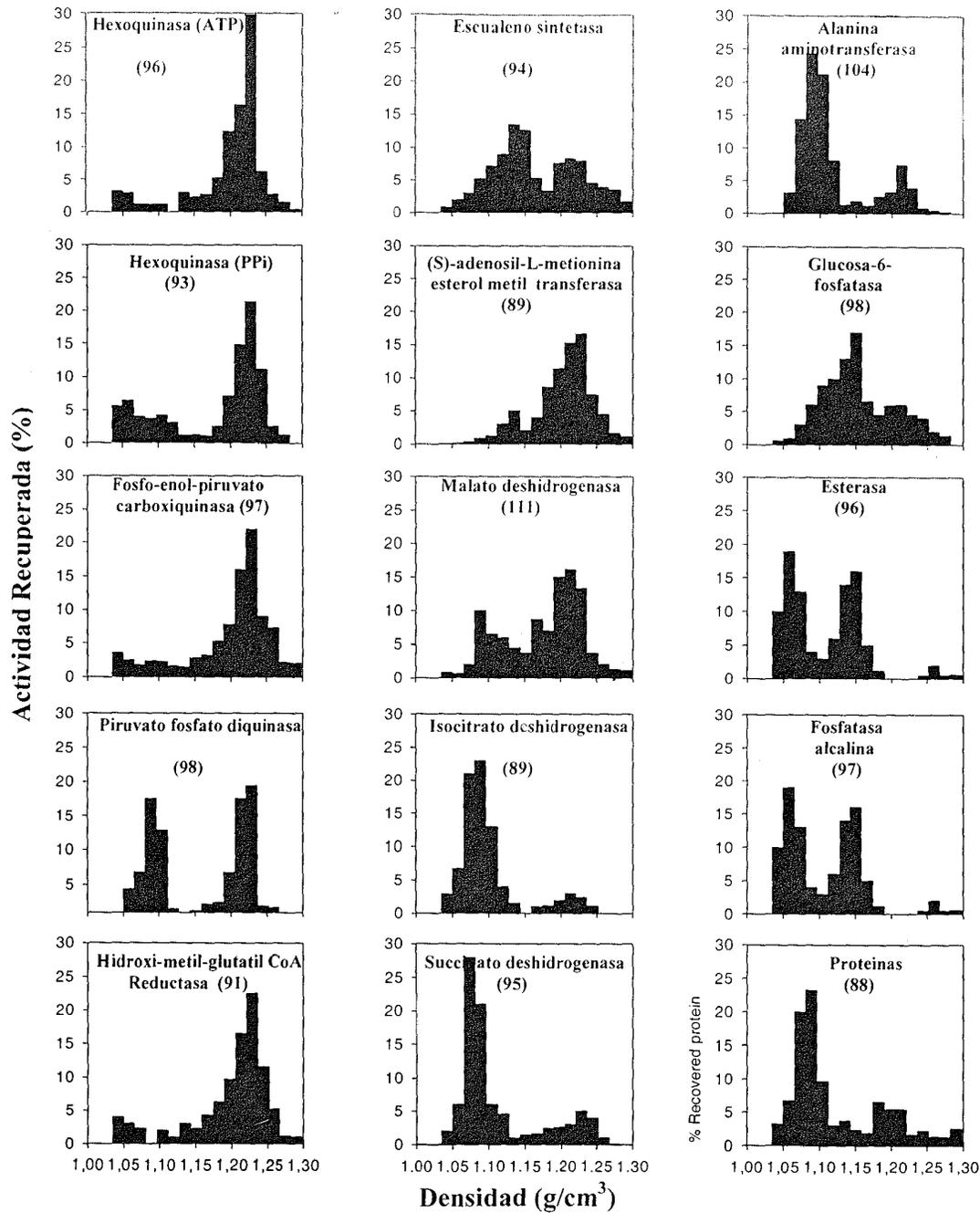
Para determinar la ubicación de la SQS en los glicosomas y microsomas se realizó una separación de fase con Tritón X-114. A las **FRD** y **FS** obtenidas, luego de la separación de fase, se les midió la actividad SQS y se encontró el 100% asociada a la **FRD**, que corresponde a la fase rica en membrana de dichas organelas, tanto en *T. cruzi* y *L. mexicana* ( Ver Tabla 1). Esto coincide con lo publicado anteriormente por Devarenne y colaboradores (1998), ya que a esta enzima se le atribuye un dominio de anclaje en la membrana en su secuencia N-terminal.

**Tabla 1.** Separación de fases con Tritón X-114 de microsomas y glicosomas purificados de epimastigotes de *T. cruzi*, crecidos en fase pre-exponencial (0.4 D.O.). Se midió la actividad de la enzima escualeno sintetasa para cada una de las fracciones obtenidas de esta separación.

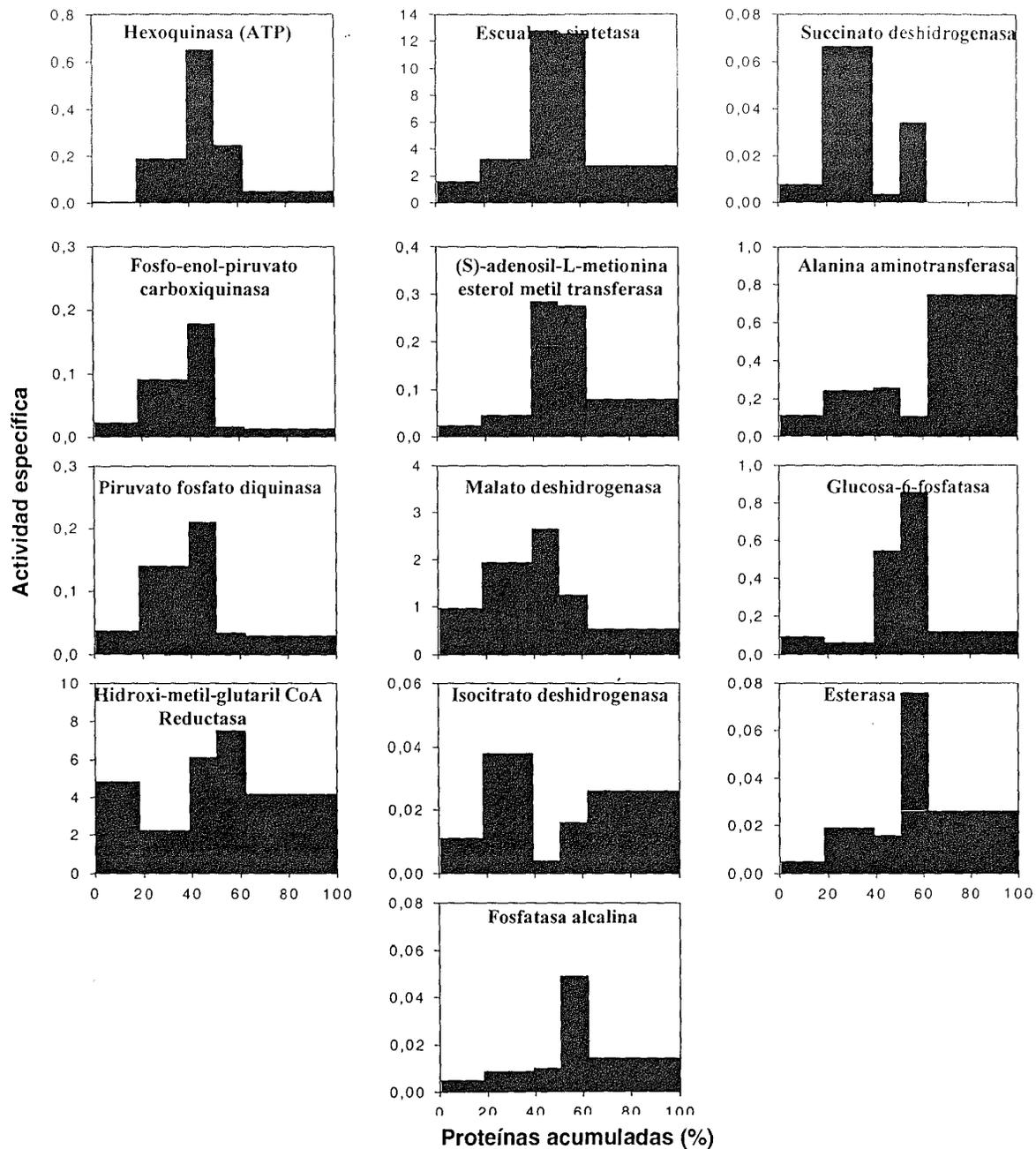
Fracciones	cpm/mg proteínas	AE (SQS) nmoles x min <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup>
Microsomas	1223678	13.50
Fracción Rica en Detergente Microsomas	1145698	12.73
Fracción Soluble Microsomas	0	0.00
Glicosomas Purificados	1298654	14.42
Fracción Rica en Detergente Glicosomas	1341279	14.90
Fracción Soluble Glicosomas	0	0.00



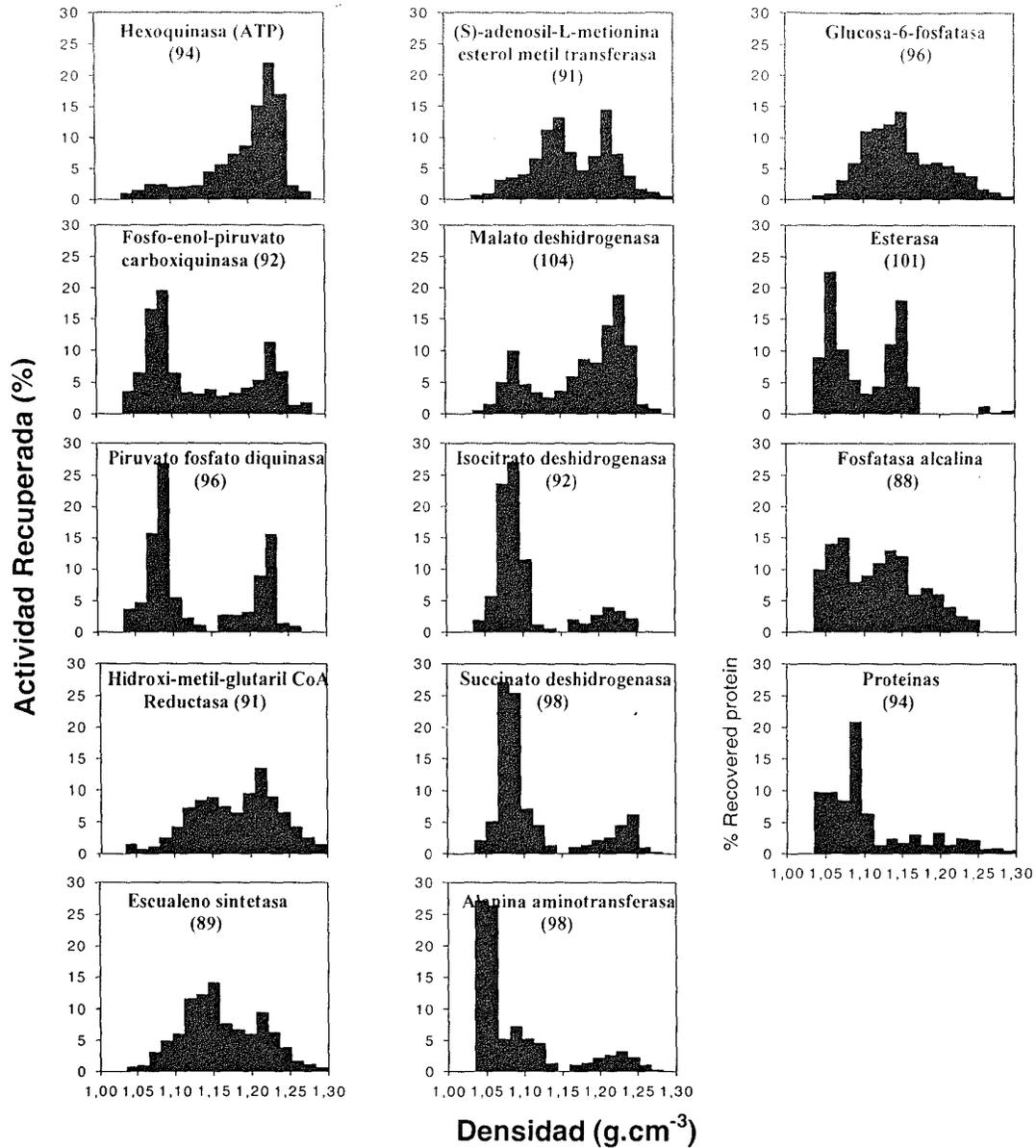
**Figura 4.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diferentes organelas para las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial de un homogenato de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial. Cada una de las barras corresponden, en orden de aparición a la FN, FGG, FRG, FM y FC.



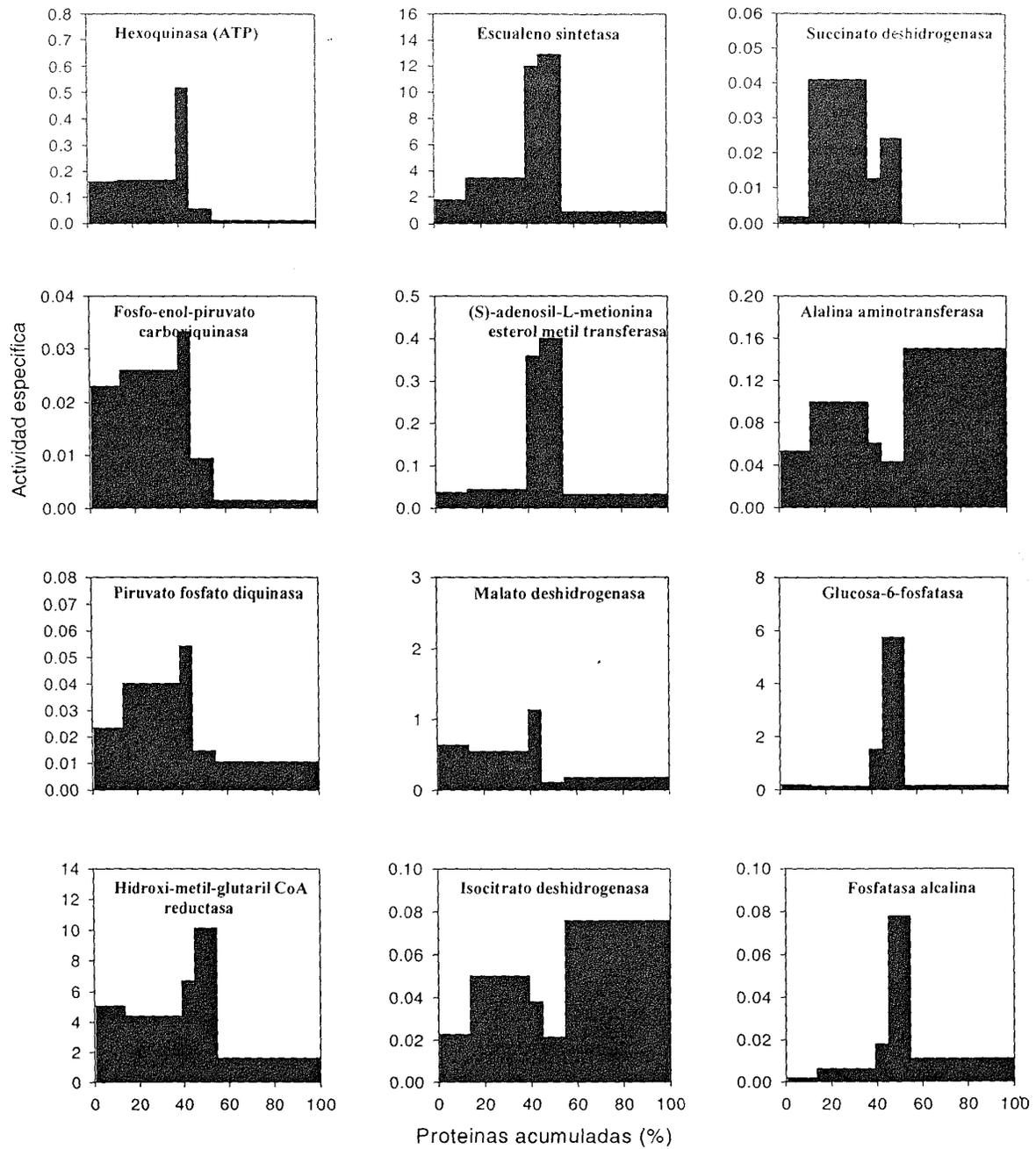
**Figura 5.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diversas organelas, de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial, después de equilibrarse en un gradiente lineal de densidad de sacarosa.



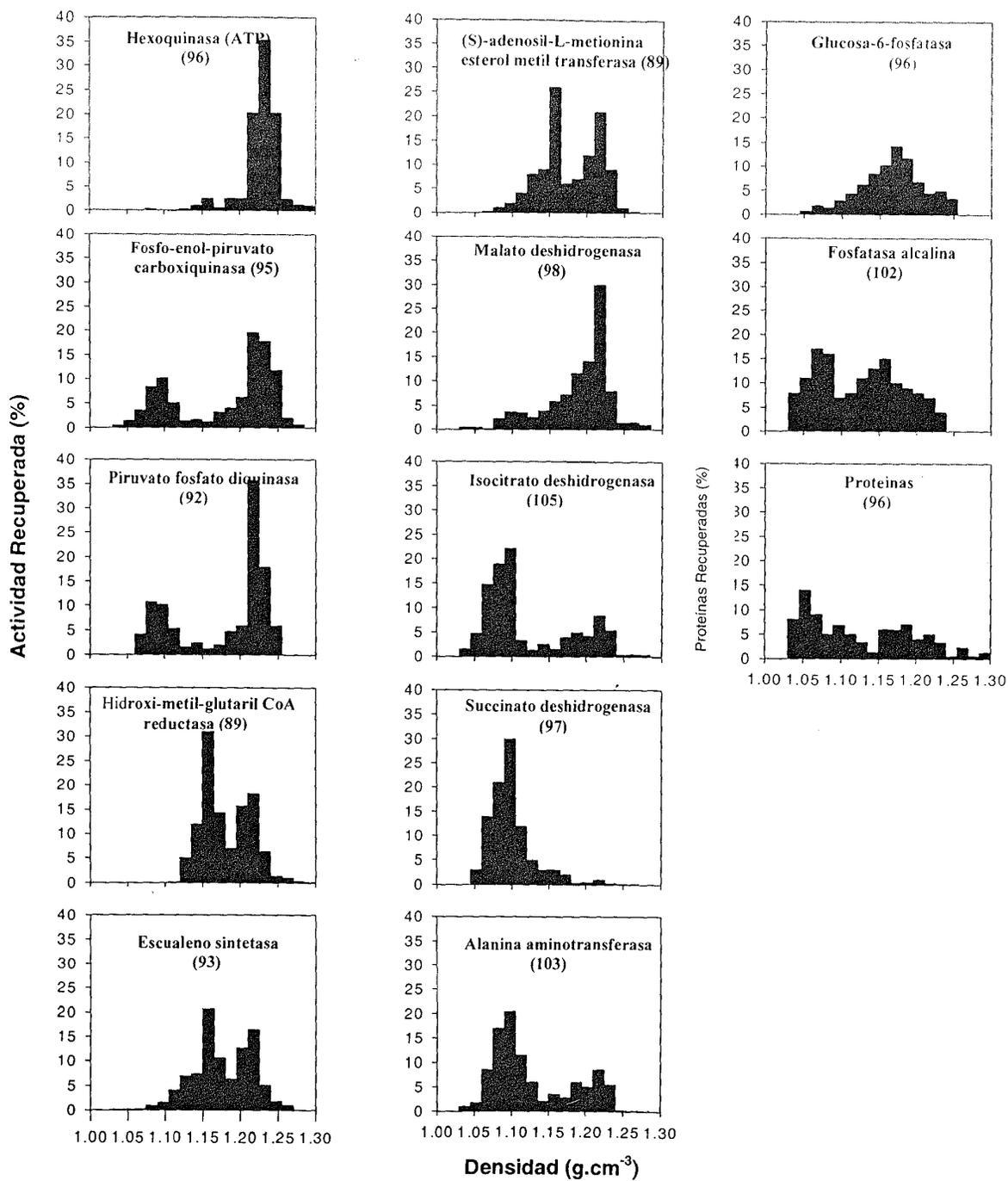
**Figura 6.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diferentes organelas para las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial de un homogenato de epimastigotes de *T. cruzi* en fase pre-exponencial.



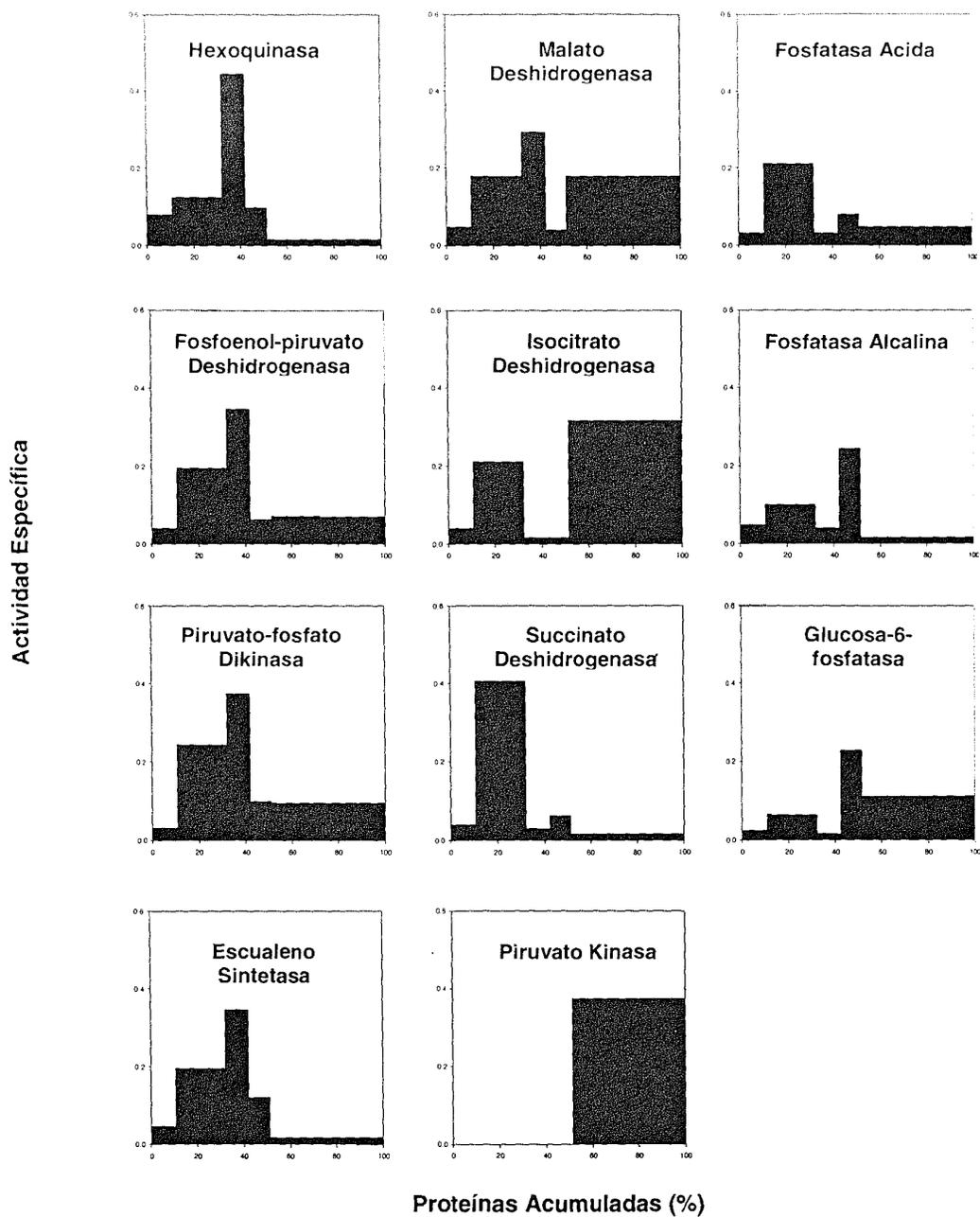
**Figura 7.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diversas organelas, de epimastigotes de *T. cruzi* en fase pre-exponencial, después de equilibrarse en un gradiente lineal de densidad de sacarosa.



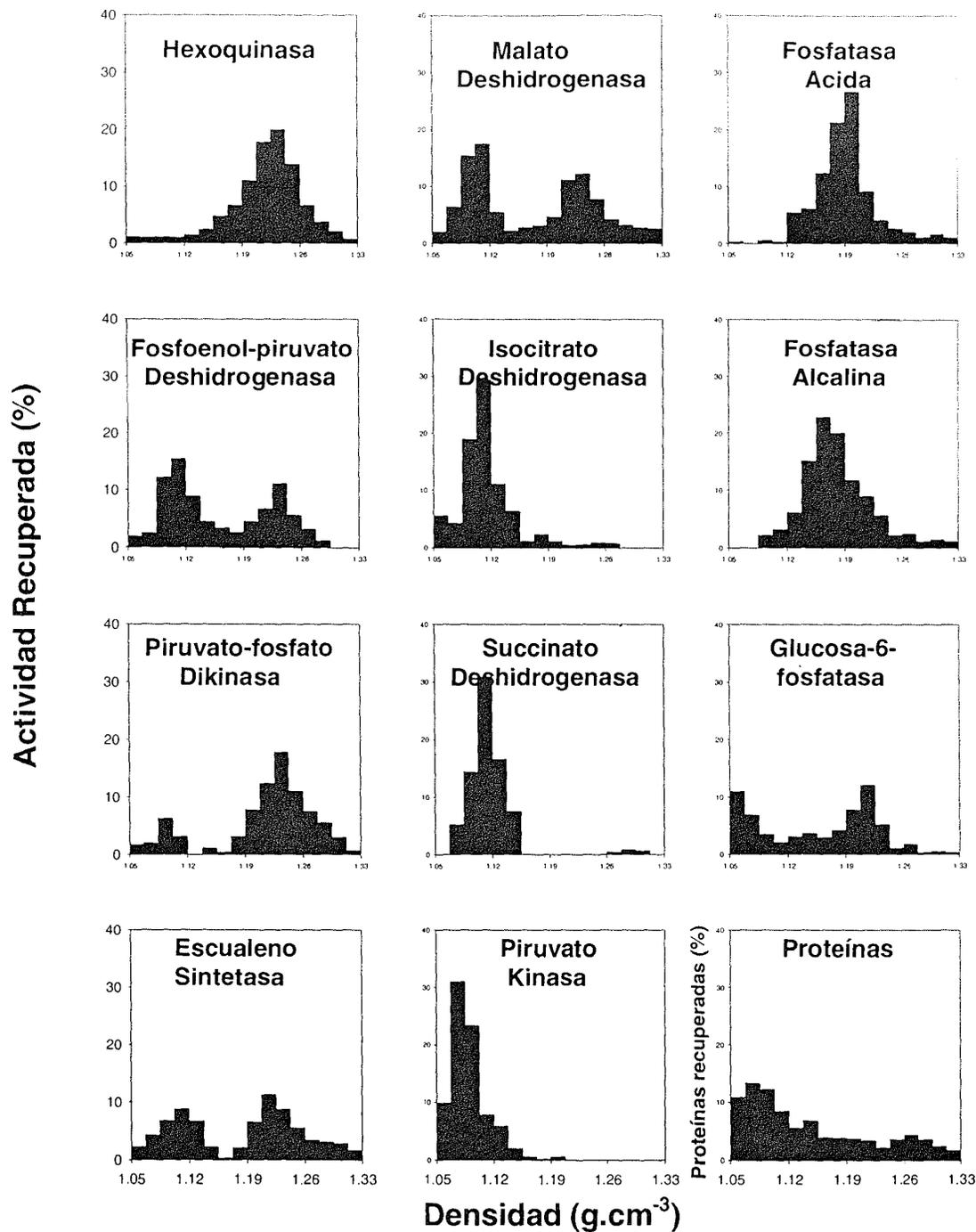
**Figura 8.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diferentes organelas para las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial de un homogenato de epimastigotes de *T. cruzi* en fase estacionaria.



**Figura 9.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diversas organelas, de epimastigotes de *T. cruzi* en fase estacionaria, después de equilibrarse en un gradiente lineal de densidad de sacarosa.



**Figura 10.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diferentes organelas para las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial de un homogenato de promastigotes de *L. mexicana* en fase exponencial.



**Figura 11.** Perfiles de distribución de las enzimas marcadoras de las diversas organelas, de promastigotes de *L. mexicana* en fase exponencial, después de equilibrarse en un gradiente lineal de densidad de sacarosa.

## 5.2. Cinética e Inhibición de la actividad Escualeno Sintetasa:

Los ensayos de actividad SQS se realizaron con diferentes concentraciones de proteínas y diferentes tiempos, para seleccionar las condiciones óptimas en las que la producción de escualeno fuese lineal. Los resultados se muestran en la figura 12.

Se seleccionaron como condiciones óptimas 150  $\mu\text{g}$  de proteínas y un tiempo de 30 minutos.

### 5.2.1. Determinación de parámetros cinéticos de la enzima escualeno sintetasa de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial:

Los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  para el NADPH y FPP para la SQS de microsomas y glicosomas son los reportados en la Tabla 2 (Ver gráficas de Lineweaver-Burk en las figuras 13-16).

**Tabla 2.** Caracterización cinética de la SQS de glicosomas y microsomas de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial.

	NADPH		FPP	
	$K_m$	$V_{m\acute{a}x}$	$K_m$	$V_{m\acute{a}x}$
<b>Glicosomas</b>	40 $\mu\text{M}$	0.45 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	2.82 $\mu\text{M}$	0.97 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$
<b>Microsomas</b>	33 $\mu\text{M}$	0.76 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	2.35 $\mu\text{M}$	1.2 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$

Estos valores son muy similares a los publicados para esta enzima de variedad de fuentes: 1) Thompson y colaboradores (1998) publicaron valores de  $K_m$  de 2.3  $\mu\text{M}$  para el FPP en la enzima humana de microsomas, y 1.0  $\mu\text{M}$  para la enzima humana solubilizada de microsomas; de 1.8  $\mu\text{M}$  para la enzima

de microsomas de rata, y 1.3  $\mu\text{M}$  para la enzima solubilizada de microsomas de rata; 2) Soltis y colaboradores (1995) publicaron valores de  $K_m$  para el NADPH de 430  $\mu\text{M}$  para la enzima humana recombinante, 500  $\mu\text{M}$  para la enzima de levadura con su extremo carboxílico truncado. El resultado más concordante con lo reportado en este trabajo, 40  $\mu\text{M}$  para la enzima truncada de hígado de rata.

### **5.2.2. Inhibición de SQS con la 3-(Bifenil-4-il)-3-hidroxi-Quinuclidina (BPQ):**

Las figuras 17 y 18 muestran las cinéticas de inhibición con BPQ-OH de la SQS de microsomas y glicosomas de epimastigotes de *T. cruzi*.

La cinética de inhibición de la enzima SQS presente en microsomas de *T. cruzi* se muestra en la Figura 17. Se puede observar en esta figura que algunas de las líneas se interceptan en un punto muy cercano al eje de las abscisas, como es para el caso de un inhibidor no-competitivo.

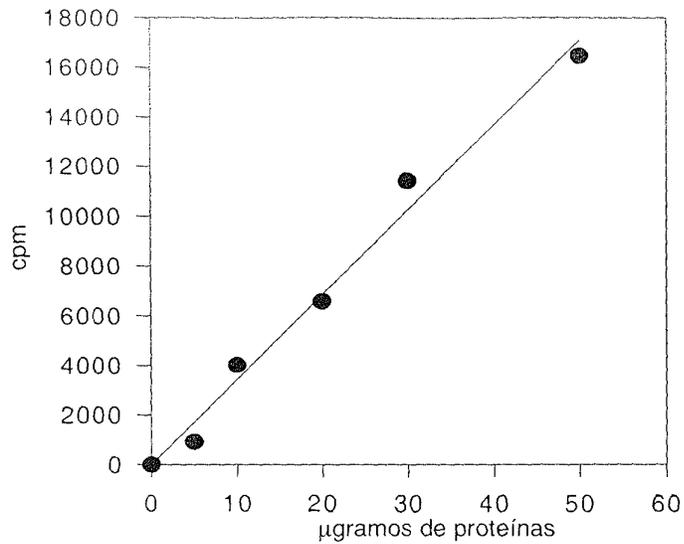
La Figura 18 muestra la cinética de inhibición de la enzima SQS presente en glicosomas de *T. cruzi*. En esta figura se observa más claramente el comportamiento de orden mixto del BPQ-OH. Esto significa que el inhibidor tiene la capacidad de unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato. Presumiblemente, un inhibidor de orden mixto se une en los sitios de unión del sustrato y de catálisis.

Las Figuras 19 y 20 muestran las curvas dosis-respuesta para la determinación de los valores de  $\text{IC}_{50}$  del BPQ-OH en la SQS de microsomas y glicosomas de *T. cruzi* y *L. mexicana*, respectivamente.

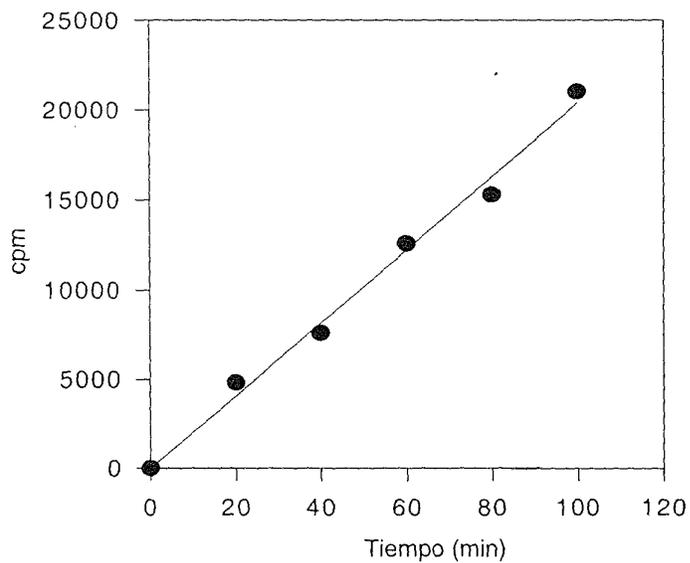
Los valores obtenidos para la caracterización de la inhibición de la SQS por parte del BPQ-OH se reportan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Valores de IC<sub>50</sub> y Ki para la inhibición con BPQ-OH de la SQS

	<i>Trypanosoma cruzi</i>		<i>Leishmania mexicana</i>
	IC <sub>50</sub>	Ki	IC <sub>50</sub>
<b>Microsomas</b>	15 nM	12 nM	21.4 nM
<b>Glicosomas</b>	50.5 nM	48 nM	28.8 nM

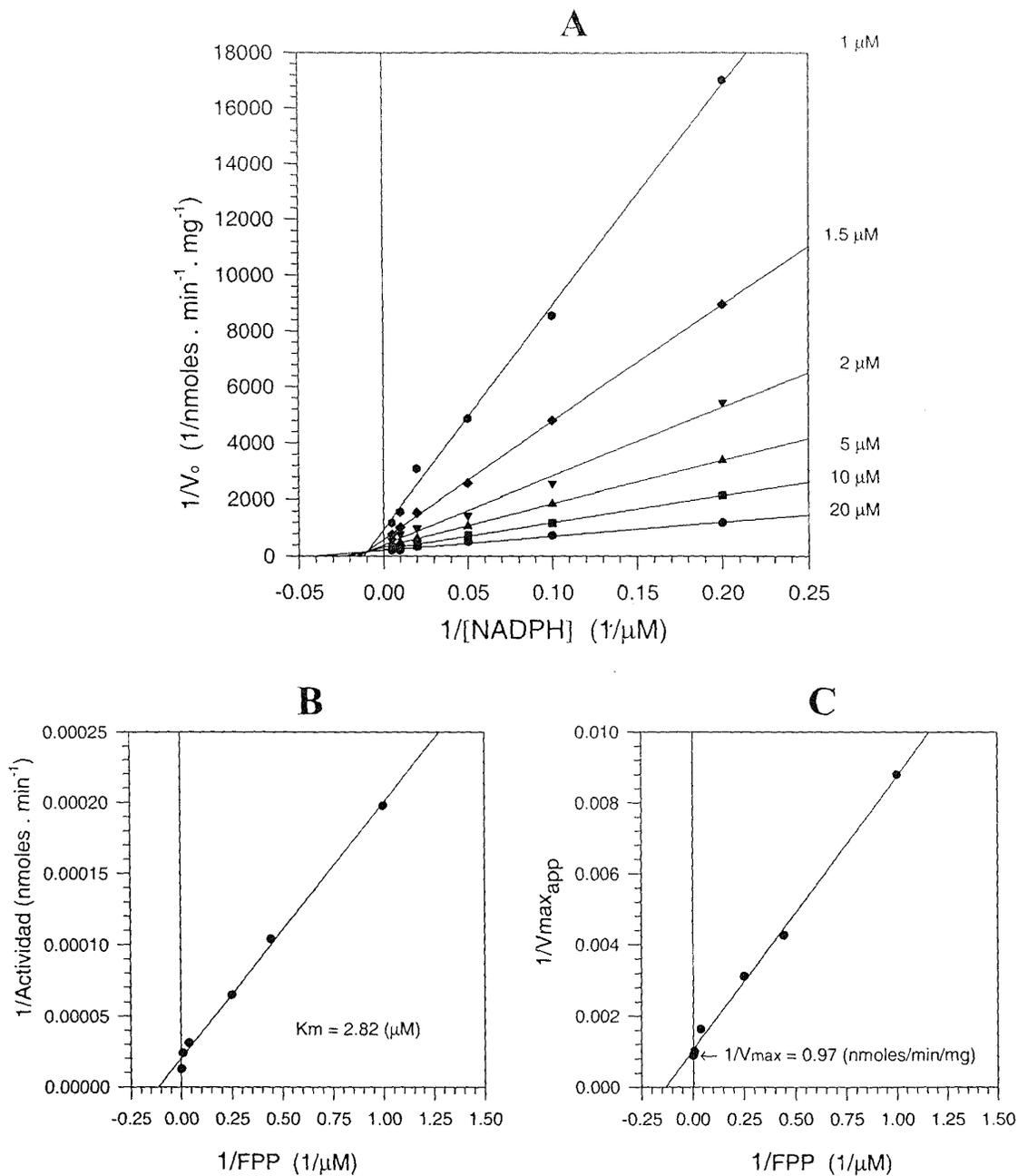


A)

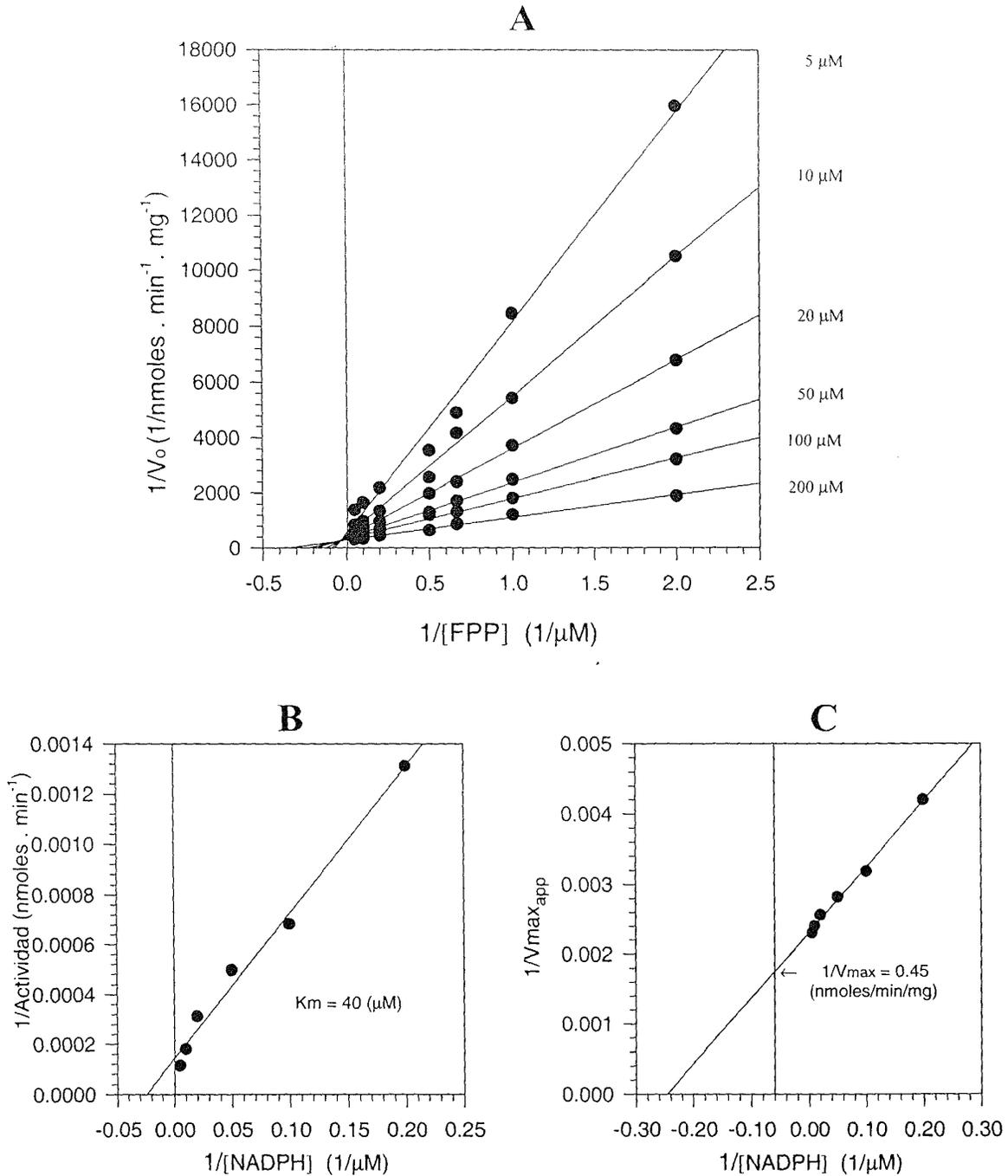


B)

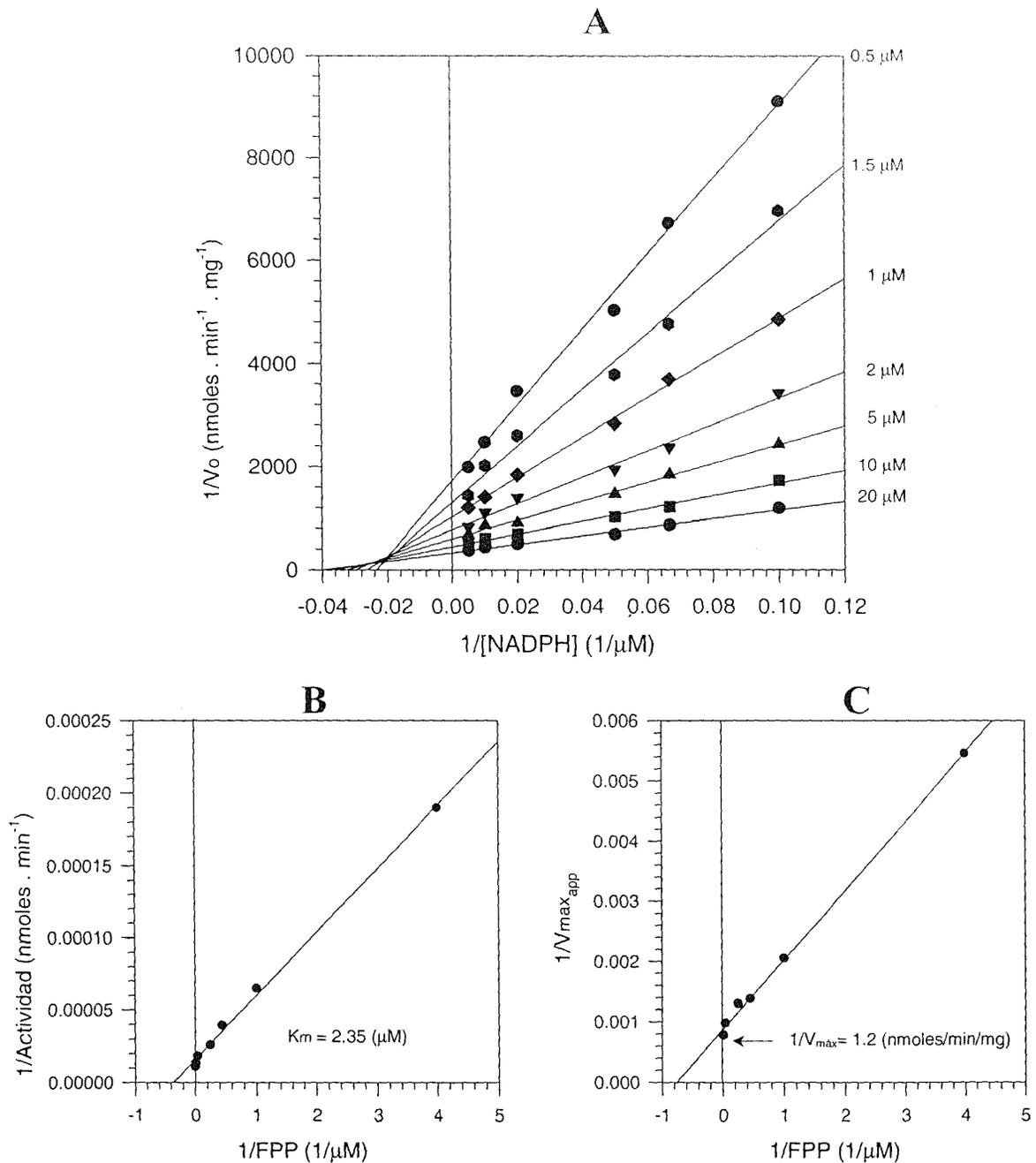
**Figura 12.** Estandarización de las condiciones óptimas de reacción de la enzima escualeno sintetasa: A) Concentración de proteínas (incubadas por 60 min a 28 °C) y; B) Tiempo (30 μg de proteínas a 28 °C).



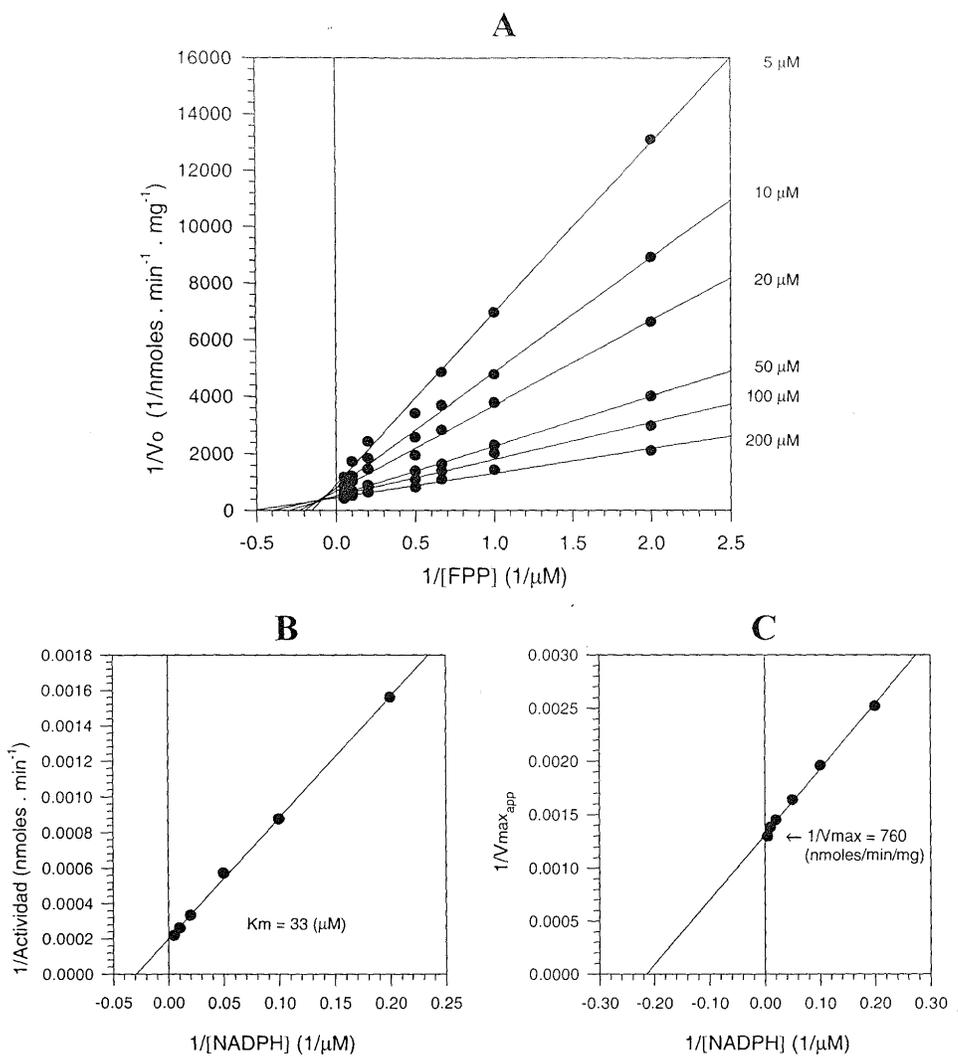
**Figura 13.** Grafica de Lineweaver-Burk para la Escualeno Sintetasa de Glicosomas purificados a partir de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial. En todos los ensayos se usaron 150  $\mu\text{g}$  de proteínas e incubadas por 30 min a 28  $^{\circ}\text{C}$ : **A**, inversos de las  $V_o$  y de las concentraciones de NADPH, manteniendo fijas las concentraciones de FPP; **B**, Determinación del  $K_m$  para el FPP y **C**, Determinación de la  $V_{\text{max}}$  para el FPP.



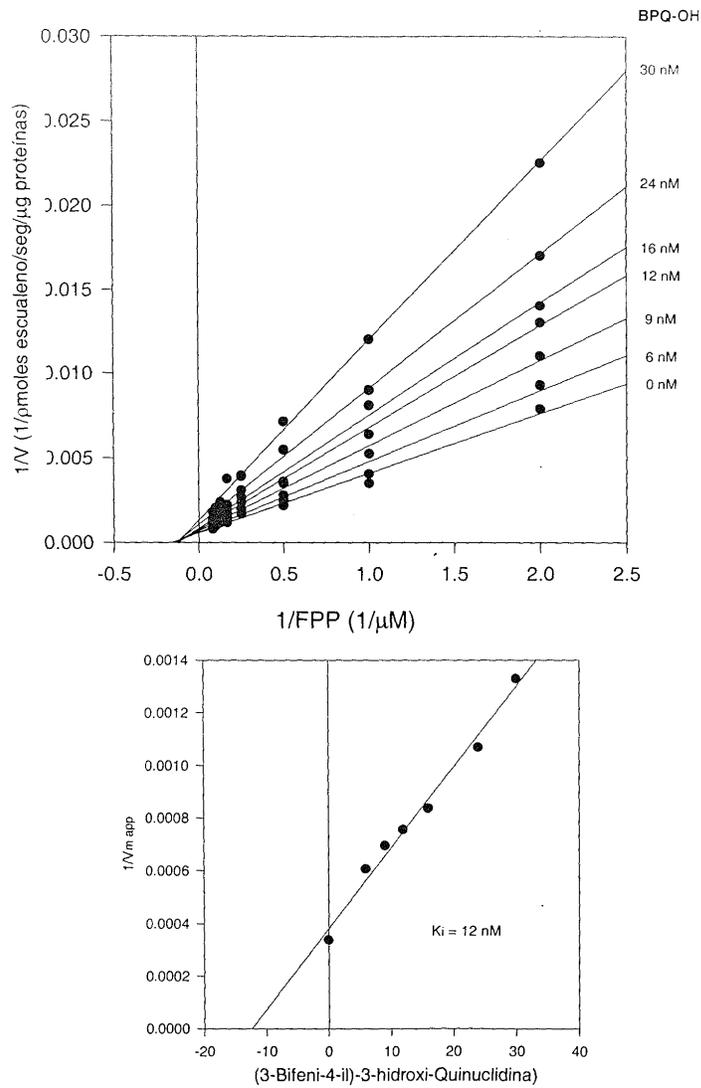
**Figura 14.** Grafica de Lineweaver-Burk para la Escualeno Sintetasa de Glicosomas purificados a partir de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial. En todos los ensayos se usaron 150  $\mu\text{g}$  de proteínas e incubadas por 30 min a 28  $^{\circ}\text{C}$ : **A**, inversos de las  $V_o$  y de las concentraciones de FPP, manteniendo fijas las concentraciones de NADPH; **B**, Determinación del  $K_m$  para el NADPH y **C**, Determinación de la  $V_{max}$  para el NADPH.



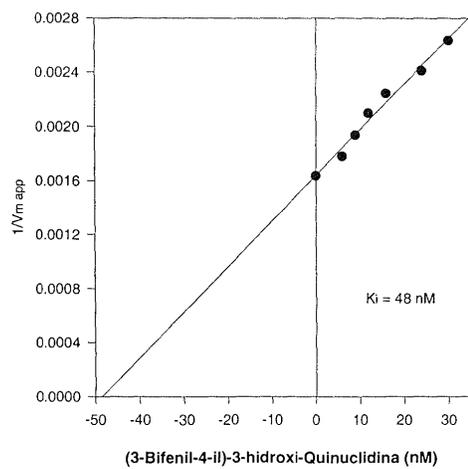
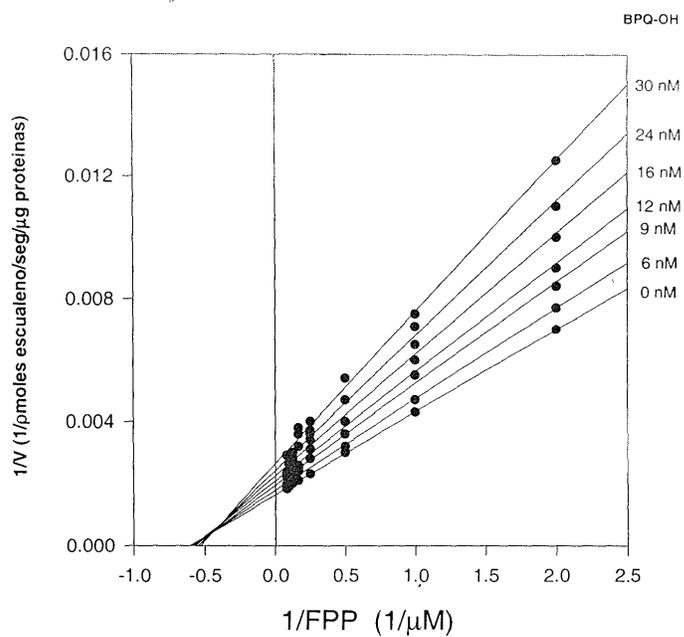
**Figura 15.** Grafica de Lineweaver-Burk para la Escualeno Sintetasa de Microsomas a partir de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial. En todos los ensayos se usaron 150  $\mu\text{g}$  de proteínas e incubadas por 30 min a 28  $^{\circ}\text{C}$ : **A)** inversos de las  $V_o$  y de las concentraciones de NADPH, manteniendo fijas las concentraciones de FPP; **B)** Determinación del  $K_m$  para el FPP y **C)** Determinación de la  $V_{\text{max}}$  para el FPP.



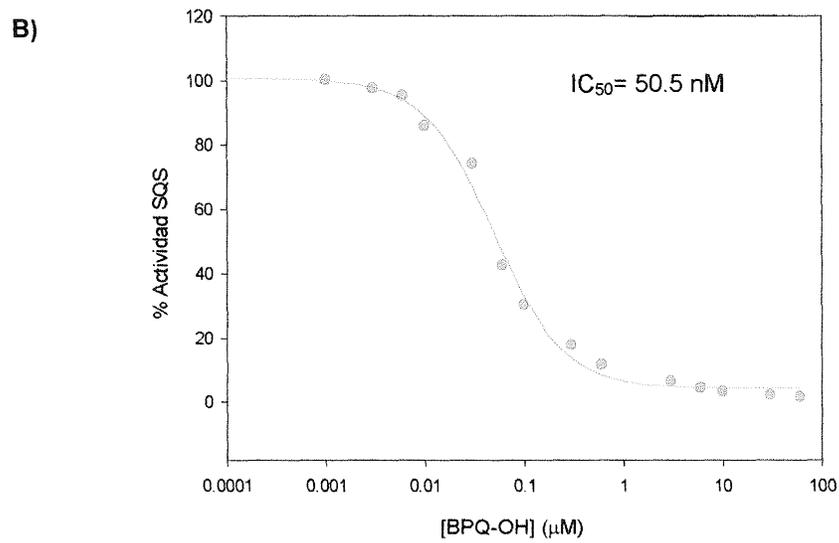
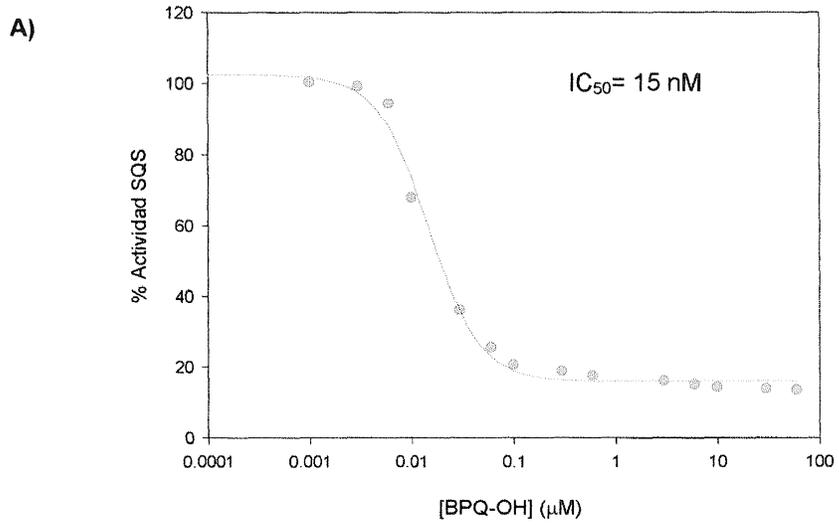
**Figura 16.** Grafica de Lineweaver-Burk para la Escualeno Sintetasa de Microsomas a partir de Epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial. En todos los ensayos se usaron 150  $\mu\text{g}$  de proteínas e incubadas por 30 min a 28  $^{\circ}\text{C}$ : **A)** inversos de las  $V_o$  y de las concentraciones de FPP, manteniendo fijas las concentraciones de NADPH; **B)** Determinación del  $K_m$  para el NADPH y **C,** Determinación de la  $V_{max}$  para el NADPH.



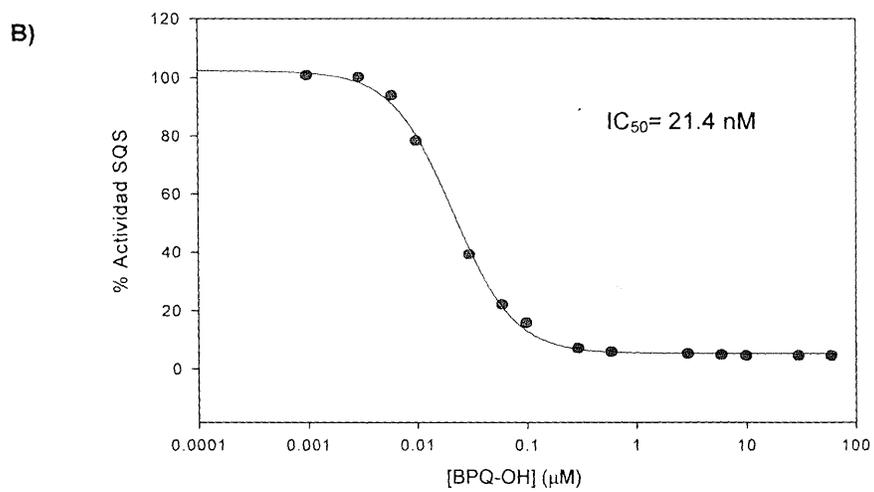
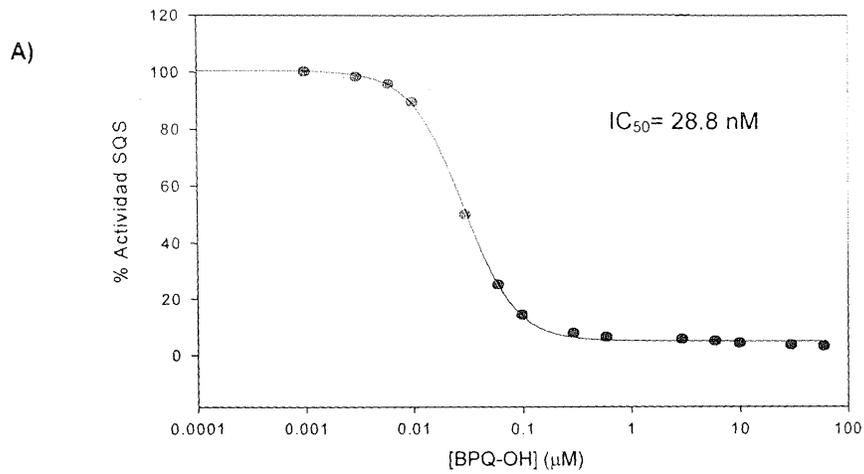
**Figura 17.** Gráficas de Lineweaver-Burk para la determinación del  $K_i$  para BPQ-OH, de la SQS de microsomas purificados a partir de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial.



**Figura 18.** Gráficas de Lineweaver-Burk para la determinación del  $K_i$  para BPQ-OH, de la SQS de glicosomas purificados a partir de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial .



**Figura 19.** Curvas Dosis-Respuesta para la determinación del IC<sub>50</sub> para BPQ en SQS de *Trypanosoma cruzi*. A) SQS de Microsomas; B) SQS de Glicosomas



**Figura 20.** Curvas Dosis-Respuesta para la determinación del IC<sub>50</sub> para BPQ en SQS de *Leishmania mexicana*. A) SQS de Glicosomas; B) SQS de Microsomas

### 5.3. Acción antiproliferativa de BPQ-OH contra células intactas.

#### 5.3.1. Efecto inhibitorio de BPQ-OH sobre el crecimiento de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, y promastigotes de *Leishmania mexicana*.

La Figura 21-A muestra el efecto antiproliferativo del BPQ-OH en epimastigotes de *T. cruzi*, en función del tiempo. La droga se agregó a las 48 horas de iniciar el ensayo, cuando la densidad celular promedio fue de  $6 \times 10^6$  células / ml.

En este ensayo se observa un efecto dosis-respuesta del BPQ-OH en la proliferación de los epimastigotes. Luego de agregada la droga, se comienza a notar una pequeña diferenciación en el número de células / ml a partir de las 72 horas, que se hace más marcada en el transcurso del tiempo. La concentración más alta 20  $\mu$ M de BPQ presentó un porcentaje de crecimiento relativo menor (69.17%) respecto al control.

Los valores de  $IC_{50}$  para BPQ-OH, obtenidos son 43,52  $\mu$ M para el porcentaje de crecimiento relativo, y 18,92  $\mu$ M para la tasa de crecimiento relativa (ver Figura 23).

Al examinar los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* al microscopio de luz se observan formas ovaladas a partir de una concentración de 2.5  $\mu$ M de BPQ. Estas formas se van haciendo más numerosas, hasta hacerse mayoría para 10 y 20  $\mu$ M de BPQ-OH; mientras que en el control permanecen con la morfología normal.

La motilidad de los parásitos también se ve afectada. Se comienza a notar su disminución a partir de 5  $\mu$ M, hasta volverse prácticamente inmóviles a 20  $\mu$ M de BPQ-OH.

La figura 21-B muestra el efecto antiproliferativo de BPQ-OH en promastigotes de *L. mexicana*. Se nota que durante las primeras 24 horas, después de agregar la droga, no hay una diferenciación importante en el crecimiento de los parásitos. A partir de las 48 horas se comenzó a notar un

efecto dosis-respuesta de la proliferación en función del tiempo. Las concentraciones más pequeñas 0.1, 0.3 y 1  $\mu\text{M}$  no presentaron diferencias notables en el número de células / ml. A partir de 3  $\mu\text{M}$  se notó un efecto marcado, y para 30  $\mu\text{M}$  (la concentración más alta), a las 48 horas el crecimiento celular prácticamente se detuvo.

El efecto de la droga también se evidenció al observar los promastigotes al microscopio de luz donde, a partir de 10  $\mu\text{M}$ , se comenzaron a observar numerosas formas ovaladas que se hicieron predominantes a 30  $\mu\text{M}$ . Mientras, en el control se observaron las formas alargadas normales. De igual manera la motilidad se vio afectada por la droga, notándose que en 10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$  esta propiedad se vio atenuada.

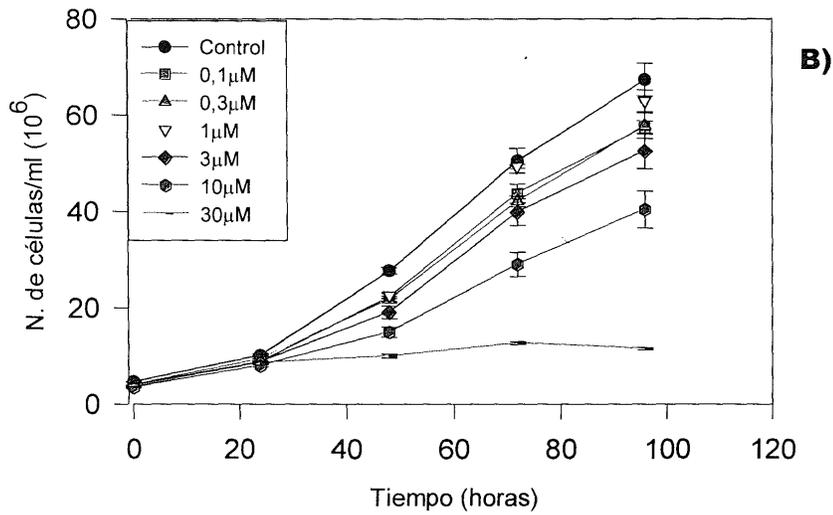
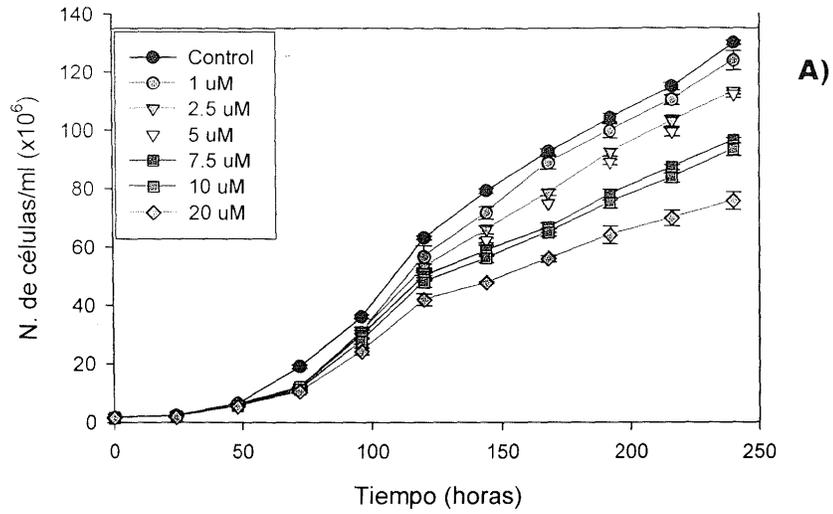
En la Figura 22, se pueden comparar los resultados de 3 métodos para medir el efecto del BPQ sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*.

La Figura 22-A muestra la curva de D.O. (convertido en Número de células / ml) vs tiempo; en ésta se observa un efecto, no muy marcado, a concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  y 150  $\mu\text{M}$  de BPQ-OH que comienza a hacerse más notable luego de 4 días de haberse agregado la droga al cultivo.

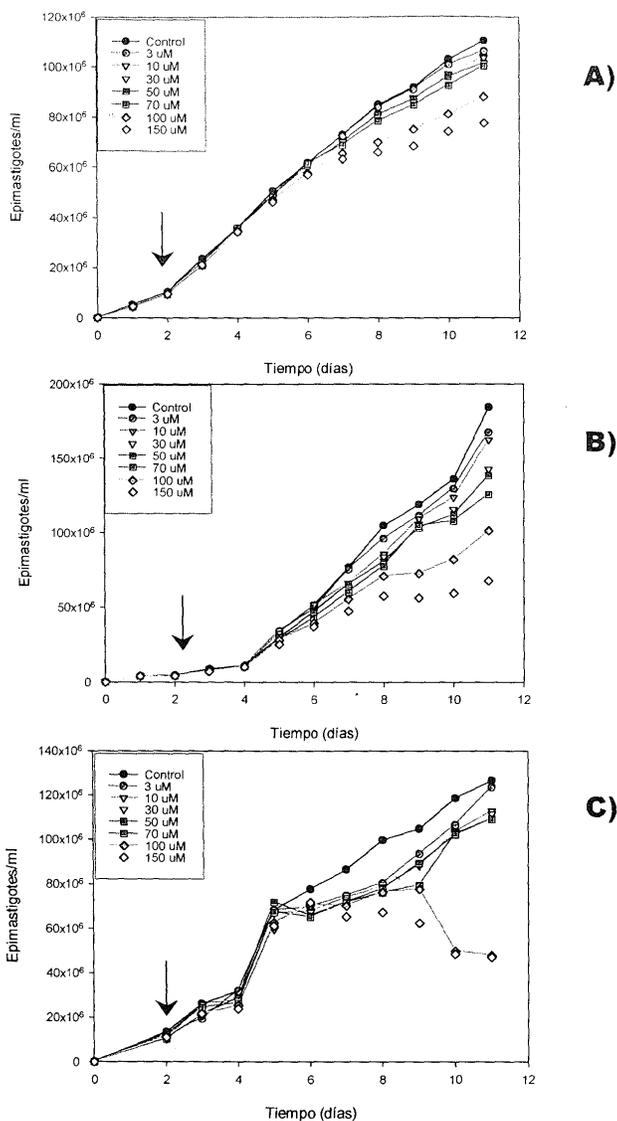
La Figura 22-B muestra la curva de número de células / ml (cuantificadas por el método de Pizzi-Brener) vs tiempo; en ésta, el efecto de 100  $\mu\text{M}$  y 150  $\mu\text{M}$  es mucho mayor. Las curvas de crecimiento para las diferentes concentraciones de BPQ-OH se comienzan a diferenciar al segundo día, luego de agregar la droga al cultivo.

La Figura 22-C muestra la curva de actividad esterasa (convertido en número de células / ml) vs tiempo, donde se observa una pérdida considerable de la viabilidad celular a 100  $\mu\text{M}$  y 150  $\mu\text{M}$ , y las curvas para cada una de las concentraciones de BPQ-OH se comienzan a diferenciar a partir del segundo día de agregada la droga al cultivo.

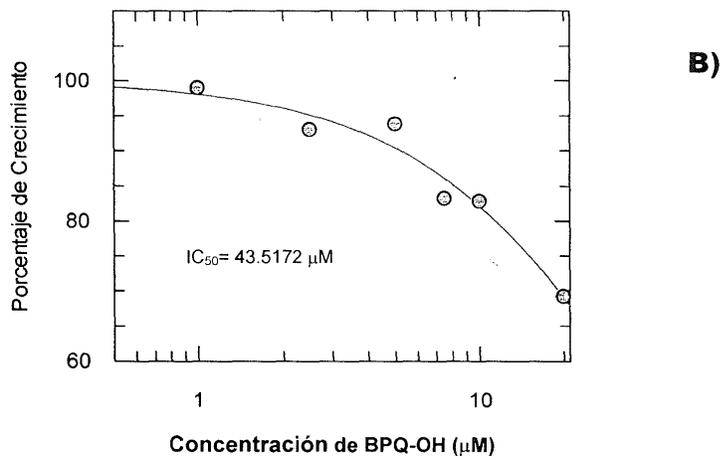
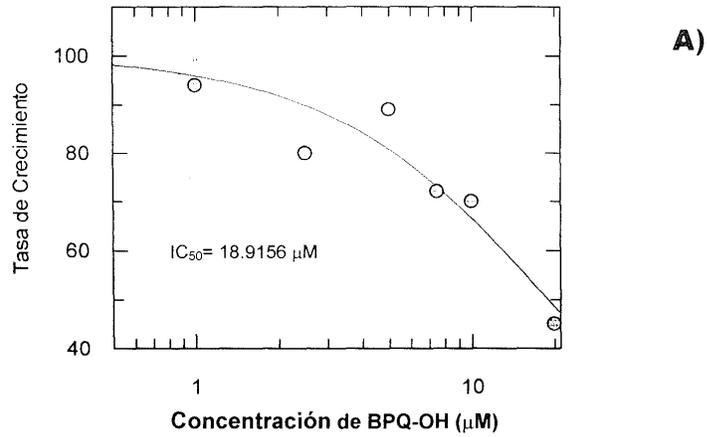
Los valores de  $\text{IC}_{50}$  fueron 16,93 y 11,91  $\mu\text{M}$  para el porcentaje de crecimiento relativo, y la tasa de crecimiento relativa, respectivamente para promastigotes de *L. mexicana* (Figura 24).



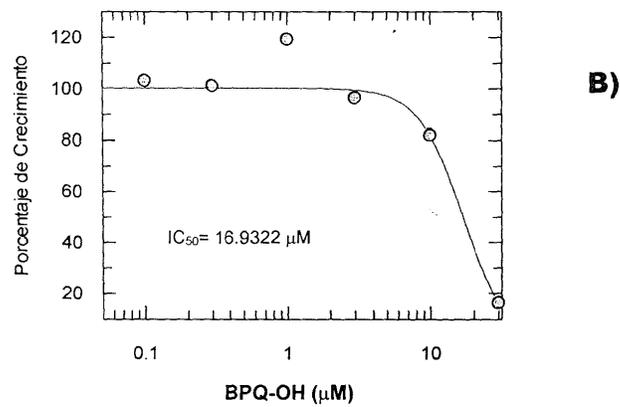
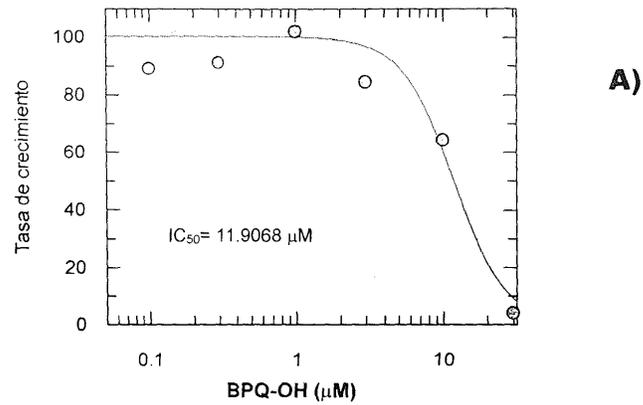
**Figura 21.** Efecto de BPQ-OH en la proliferación de: A) epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y; B) promastigotes de *Leishmania mexicana*.



**Figura 22.** Comparación del efecto de BPQ-OH en la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, por 3 métodos diferentes: A) Curva de crecimiento; B) Número de células/ml por el método de Pizzi-Brenner; y C) Actividad Esterasa. **Nota:** Los valores de D.O. (600nm) y unidades de esterasa/ml fueron transformados a número de células/ml, mediante el uso de curvas patrones. El número de células/ml fue determinado mediante el método de Pizzi-Brenner. La flecha indica el día que se añadió la droga al cultivo.



**Figura 23.** Efecto de BPQ-OH sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*. Los cálculos de IC<sub>50</sub> se realizaron a partir de: A) Tasa de crecimiento relativa y; B) Porcentaje de crecimiento relativo.



**Figura 24.** Efecto de BPQ sobre el crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana*. Los cálculos de  $\text{IC}_{50}$  se realizaron a partir de: A) Tasa de crecimiento relativa y ; B) Porcentaje de crecimiento relativo.

### 5.3.2. Efecto de BPQ-OH sobre la síntesis de novo de esteroides en epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. mexicana*:

La Figura 25 compara los espectros de masas de esteroides libres característicos detectados en los extractos de los parásitos. El espectrómetro de masas tuvo una precisión de 96-99% al momento de identificar y asignar las estructuras de los compuestos.

La Tabla 4 muestra la composición de lípidos neutros de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con BPQ-OH y sin tratar. La composición de esteroides de los parásitos controles (sin tratar con BPQ-OH) fue la esperada, con el ergosterol, su análogo 24-etil y precursores representando más del 70% de los esteroides libres; el colesterol estuvo presente también, pero a niveles muy bajos <20% (Lira y colaboradores, 2001; Martín y colaboradores, 2000; Urbina y colaboradores, 1998; Urbina y colaboradores, 1999; Urbina, 2000; Urbina y colaboradores, 2000). Este compuesto provoca una disminución en los niveles de esteroides endógenos, los cuales prácticamente desaparecen a concentraciones altas de BPQ-OH. El cultivo tratado con 20  $\mu$ M de BPQ-OH (concentración más alta) presentó un 5.8% de ergosterol como único esteroide endógeno, y un 94.2% de colesterol (esteroide exógeno). Los esteroides endógenos 24-etil-5,7,22-colesta-trien-3 $\beta$ -ol, y 24-etil-5,7-colesta-dien-3 $\beta$ -ol, mostraron un cierto grado de acumulación a medida que la concentración de BPQ-OH aumentó hasta 10  $\mu$ M, y a 30 $\mu$ M desaparecieron drásticamente.

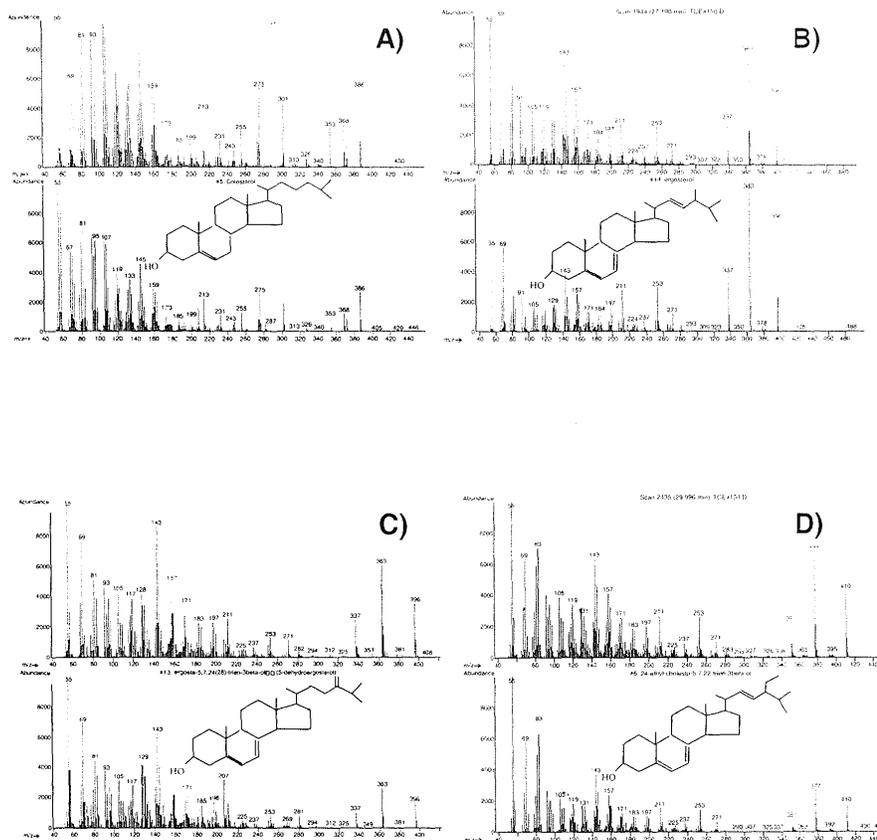
La Figura 26 compara los cromatogramas obtenidos a partir de los lípidos neutros extraídos de epimastigotes de *T. cruzi*, sin tratar con BPQ-OH (Control, Figura 26-A), y con una concentración de 10  $\mu$ M de BPQ-OH (Figura 26-B). Se pudo observar una disminución considerable de los picos correspondientes a los esteroides endógenos. Mientras que el pico correspondiente al colesterol (con un tiempo de retención promedio de 24.8 minutos) aumentó.

En la Tabla 5 se muestra la composición de lípidos neutros de *L. mexicana* en presencia de BPQ-OH. La composición de esteroides de las células sin tratar fue la esperada, con el episterol y el 5-dehidro-episterol representando

más del 85% de los esteroides libres; el colesterol estuvo presente en un porcentaje menor al 10%. Respecto a las células tratadas, es evidente la acumulación del colesterol y la desaparición gradual de esteroides endógenos 14 desmetil y 14 metil a medida que las células fueron tratadas con concentraciones más altas de BPQ-OH. De hecho, en 30  $\mu$ M de BPQ-OH, el colesterol (exógeno), representó la totalidad de los lípidos neutros que componen la membrana del parásito (>99%).

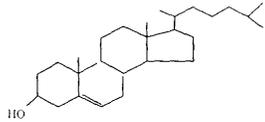
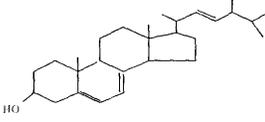
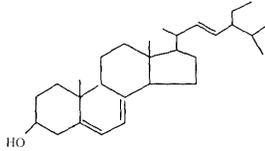
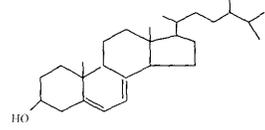
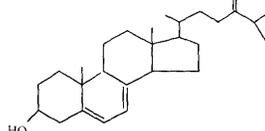
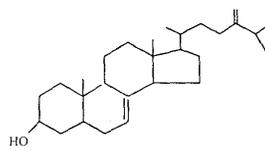
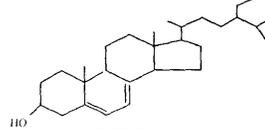
La Figura 27 compara los cromatogramas de esteroides libres extraídos a partir de promastigotes de *L. mexicana* sin tratar (control, Figura 27-A), y con una concentración de 30  $\mu$ M de BPQ-OH. En esta figura se observó la desaparición de los esteroides endógenos, mientras que el pico correspondiente al colesterol aumentó considerablemente.

En la Figura 28 se muestra el efecto de BPQ-OH en la proporción de esteroides endógenos/exógenos de los parásitos. Tanto para *T. cruzi* como para *L. mexicana* se observa un efecto dosis-respuesta, aunque en *T. cruzi* este efecto comienza a notarse a partir de 5  $\mu$ M de BPQ-OH.

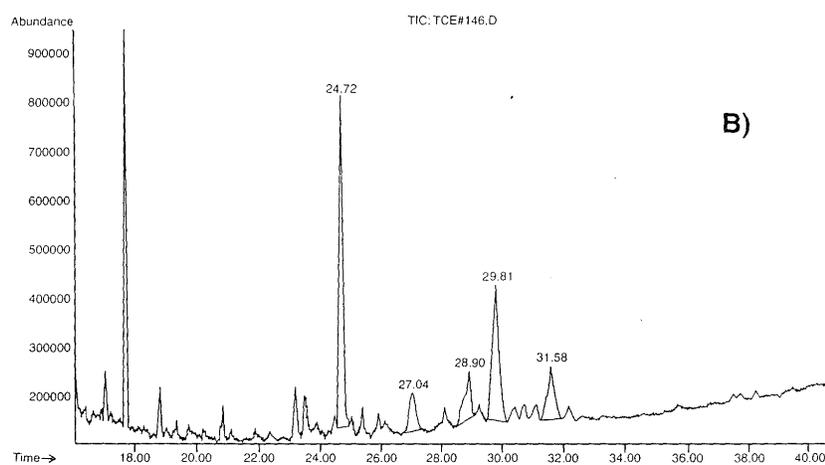
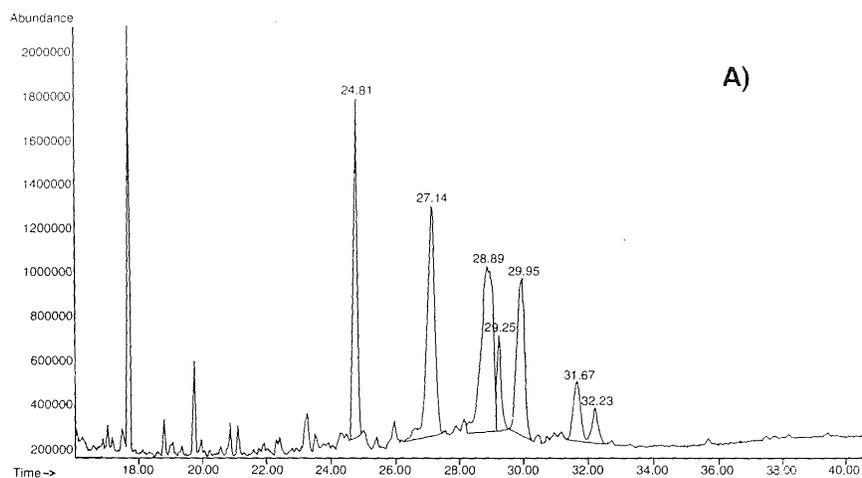


**Figura 25.** Espectros de masas de esteroides libres detectados en los extractos de epimastigotes de *T. cruzi*, y promastigotes de *L. mexicana*. **A)** Colesterol ; **B)** Ergosterol; **C)** (5-dehidroergosterol) y; **D)** 24-etil-colesta-5,7,22-trien-3β-ol.

**TABLA 4.** Efecto de 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxi-quinuclidina (BPQ-OH) sobre la composición de esteroides libres de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (EP stock)<sup>a</sup>

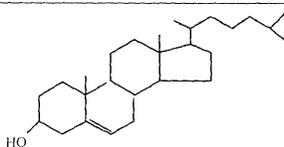
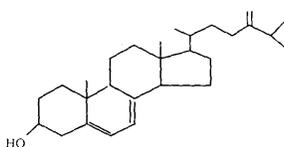
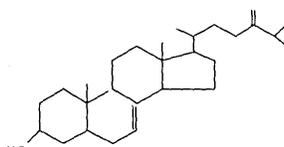
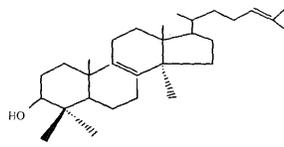
NOMBRE	ESTRUCTURA	CONTROL	BPQ-OH 1µM	BPQ-OH 2.5µM	BPQ-OH 5µM	BPQ-OH 10µM	BPQ-OH 20µM
EXOGENOS:							
COLESTEROL		18.2	17.2	18.3	23.2	37.3	94.2
ENDOGENOS:							
24-METHYL-5,7,22- CHOLESTA-TRIEN- 3β-OL (ERGOSTEROL)		26.6	21.5	16.8	14.6	8.6	5.8
24-ETHYL-5,7,22- CHOLESTA- TRIEN - 3β-OL		15.6	18.8	21.7	23.3	30.4	n.d.
ERGOSTA-5,7- DIEN-3β-OL		17.0	21.6	22.1	21.2	10.2	n.d.
ERGOSTA- 5,7,24(24')-DIEN- 3β-OL		11.3	7.2	7.4	5.3	n.d.	n.d.
ERGOSTA- 7,24(24')-DIEN- 3β-OL		5.3	4.9	3.4	2.9	n.d.	n.d.
24-ETHYL-5,7- CHOLESTA-DIEN- 3β-OL		6.0	8.8	10.4	9.5	13.6	n.d.

<sup>a</sup>Los esteroides fueron extraídos a partir de epimastigotes de *T.cruzi* cultivados en medio LIT en presencia y ausencia de la droga por 120 horas; la droga fue adicionada a una densidad celular de  $5 \cdot 10^6$  epimastigotes/ml. Los esteroides fueron separados de los lípidos polares por cromatografía en columnas de ácido silícico, y analizados cuantitativamente por cromatografía gas-líquida y espectrometría de masa. Los resultados son expresados en porcentaje de masa.

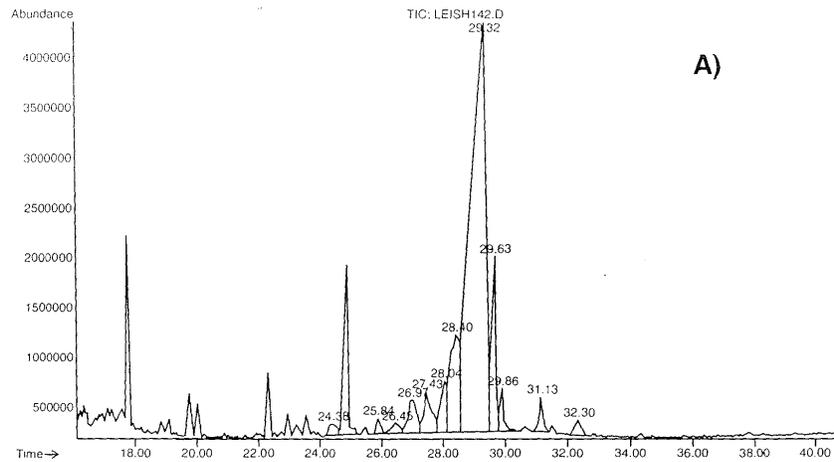


**Figura 26.** Cromatogramas de lípidos neutros obtenidos a partir de Extractos de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con: A) 0  $\mu\text{M}$  de BPQ-OH (Control); y B) 10  $\mu\text{M}$  de BPQ-OH; separados por cromatografía de gases.

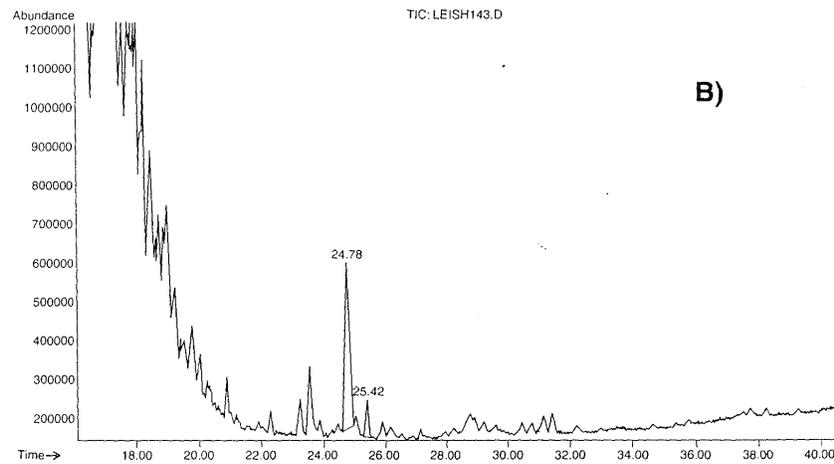
**TABLA 5.** Efecto de 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxi-quinuclidina (BPQ-OH) en la composición de esteroides libres de promastigotes de *Leishmania mexicana* (NR)<sup>a</sup>

COMPUESTO	ESTRUCTURA MOLECULAR	CONTROL	1 $\mu$ M BPQ-OH	3 $\mu$ M BPQ-OH	10 $\mu$ M BPQ-OH	30 $\mu$ M BPQ-OH
<b>Exogenos:</b>						
Colesterol		8.1	12.1	14.8	34.8	>99
<b>Endogenos, 14 desmetil:</b>						
Ergosta-5,7,24(24 <sup>1</sup> )-trien-3 $\beta$ -ol (5-dehidroepisterol)		82.4	79.7	79.2	58.0	n.d.
Ergosta-7,24(24 <sup>1</sup> )-dien-3 $\beta$ -ol (episterol)		7.7	7.3	6.0	7.3	n.d.
<b>Endogenos, 14 metil:</b>						
Lanosterol		1.8	0.9	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>a</sup>Los esteroides fueron extraídos a partir de células expuestas a las concentraciones de droga indicadas por 96 horas. Los esteroides fueron separados de los lípidos polares por cromatografía en columnas de ácido silícico y analizados cuantitativamente por cromatografía capilar gas-liquida, y espectrometría de masa. La composición está expresada como porcentaje de masa.

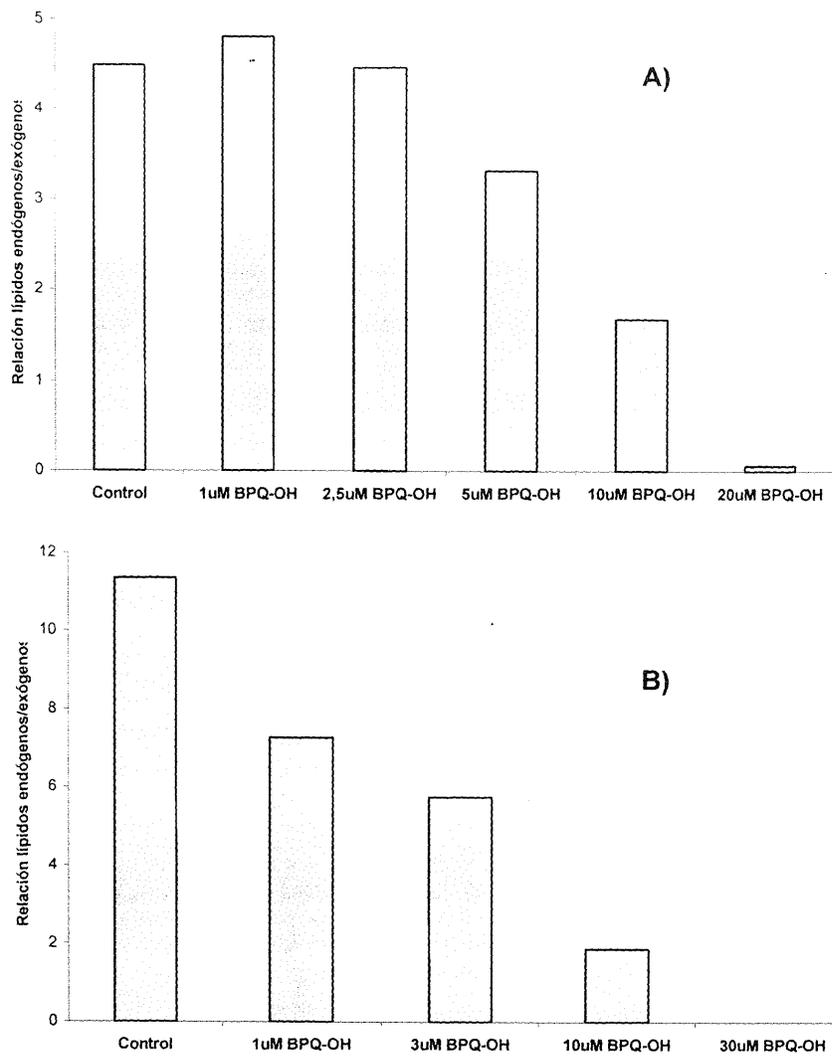


**A)**



**B)**

**Figura 27.** Cromatogramas de lípidos neutros obtenidos a partir de extractos de promastigotes de *L. mexicana* tratados con: **A)** 0  $\mu\text{M}$  de BPQ-OH (Control); y **B)** 30  $\mu\text{M}$  de BPQ-OH; separados por cromatografía de gases.



**Figura 28.** Proporción de esteroides endógenos/exógenos para las células tratadas con BPQ-OH. A) epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*; B) promastigotes de *Leishmania mexicana*.

### 5.3.3. Efecto de BPQ-OH sobre la proliferación de amastigotes de *T. cruzi*:

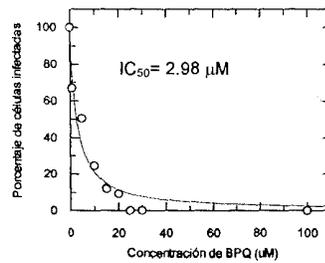
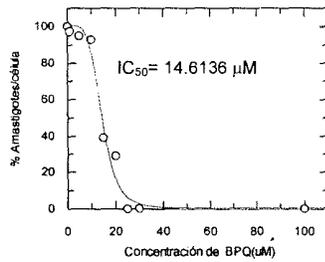
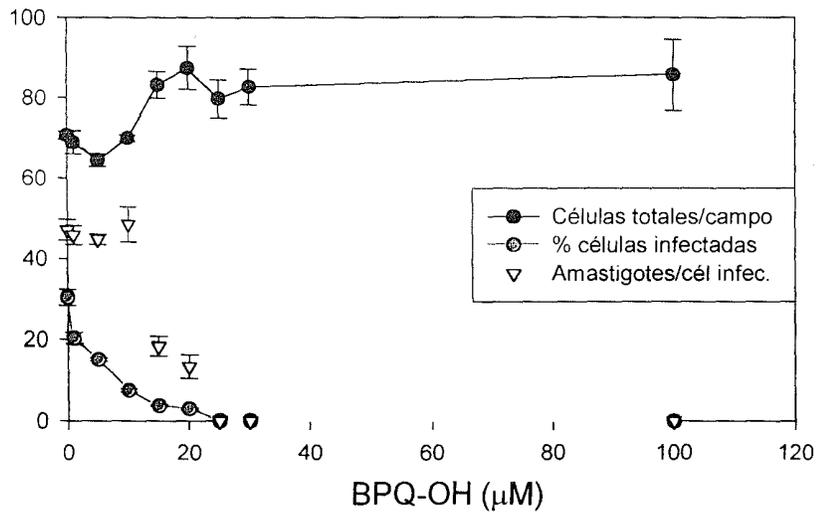
En este ensayo (Fig. 29-A) se observa claramente un efecto dosis-respuesta de la droga en la proliferación de amastigotes (forma clínicamente relevante), así como en el porcentaje de células infectadas por campo.

Se observa una disminución gradual del porcentaje de células infectadas a partir de 1  $\mu\text{M}$ . A 25  $\mu\text{M}$  ya no se observan células infectadas.

El número de amastigotes/cél comienza a disminuir a partir de 15  $\mu\text{M}$ . A partir de 25  $\mu\text{M}$  se produce un 100% de inhibición.

En las figuras 29-B y 29-C se presentan los valores de  $\text{IC}_{50}$ , calculados a partir del porcentaje de amastigotes/célula y del porcentaje de células infectadas, respectivamente.

El valor obtenido a partir del porcentaje de células infectadas (2.98  $\mu\text{M}$ ) es mucho menor que el obtenido para el porcentaje de amastigotes/célula (14.61  $\mu\text{M}$ ). Esto pareciera ser reflejo de que el efecto del BPQ-OH se da en las etapas tempranas de diferenciación tripomastigote-amastigote.



**Figura 29.** A) Efecto de BPQ-OH sobre amastigotes intracelulares de *Trypanosoma cruzi*. Determinación del  $IC_{50}$  a partir de: B) Porcentaje de amastigotes/célula; y C) Porcentaje de células infectadas/campo.

## 6. DISCUSION:

### 6.1. Ubicación subcelular de la Escualeno Sintetasa en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*:

Durante la separación de partículas mediante centrifugación diferencial existen factores críticos que intervienen en su sedimentación. Entre estos están: el radio y la densidad de la partícula, la viscosidad y densidad del medio, el coeficiente friccional de la partícula entre otros.

La centrifugación diferencial es un proceso en el cual un lisado celular es centrifugado a una velocidad determinada, que solo remueve los componentes celulares más densos que la organela deseada, seguido de una centrifugación a una velocidad que baja el componente de interés. Sin embargo, a veces se hace difícil separar ciertos componentes, ya que se puede producir una combinación desfavorable de diferencia en los radios y densidades de éstos (Voet y Voet, 1994).

Los gradientes de densidad son usados para producir fracciones isopícnicas, ya que una partícula cesa de migrar cuando la relación  $\rho - \rho_0$  se hace cero (Rolf Kinne y George Sachs, 1985).

Los resultados obtenidos en la centrifugación diferencial e isopícnica realizadas a partir de homogenatos de ambos parásitos, confirman la presencia, ya publicada por Opperdoes y colaboradores (1984) de un compartimiento subcelular denominado glicosoma.

Las características físicas de este compartimiento subcelular son similares a las ya reportadas, con un índice de flotación de 1,23gr/cm; comparables a las reportadas para la forma sanguínea y procíclica de *Trypanosoma brucei*, con una densidad de 1,25 y 1,228 g / cm<sup>3</sup>, respectivamente (Opperdoes y Borst, 1977; Opperdoes y col, 1981).

La latencia de dicha organela es de vital importancia a la hora de analizar los datos de ubicación subcelular, por ello, en nuestros ensayos, ésta fue siempre mayor al 85% en todos los estadios de crecimiento de *T. cruzi* y *L.*

*mexicana*. Ello implica que la organela tiene un alto grado de integridad, y por tanto la actividad de sus enzimas marcadoras se encuentra contaminando, en una proporción casi despreciable, otras fracciones subcelulares; excepto aquellas enzimas que presentan ubicación dual.

La ubicación de la SQS en el glicosoma representa una novedad, que junto con la publicación previa de Concepción y colaboradores (1998) de la enzima HMG-CoA reductasa en este compartimiento celular, lo colocan como una organela de particular importancia en la biosíntesis de esteroides de estos organismos. Por otro lado, su presencia en el retículo endoplasmático, coincide con lo publicado anteriormente para organismos eucariotas superiores (Krisans, 1992). Podrían existir 2 genes para las SQS en el genoma de dichos parásitos, o que estas 2 enzimas resulten de splicing o modificaciones post-traduccionales diferentes.

La PEPCK había sido anteriormente ubicada únicamente en glicosomas donde cumpliría, junto con la MDH, el papel de regenerar el ATP y el NAD<sup>+</sup> consumidos en la glicólisis. También podría funcionar en el catabolismo de aminoácidos, descarboxilando el acetil-CoA producido a partir de malato mitocondrial (Urbina, 1994). La ubicación dual de esta enzima podría reflejar las diferentes fuentes de energía que estos parásitos utilizan: carbohidratos catabolizados en los glicosomas, y aminoácidos degradados en la mitocondria. En condiciones de uso estricto de aminoácidos como ocurre en *T. cruzi* en fase estacionaria (Urbina, 1994), parece lógica su ubicación en la mitocondria, como se reporta por primera vez en el presente trabajo.

Estos organismos (*T. cruzi* y *L. mexicana*) poseen un mitocondrion grande respecto al tamaño del protozoario que es muy susceptible en el proceso la ruptura, donde se forman pequeñas vesículas de mitocondria; por ello, es muy factible que una proporción importante de aquellas enzimas solubles en la matriz mitocondrial se encuentren con enzimas citosólicas, como es el caso de la IDH.

La SDH está embebida en la membrana interna de la mitocondria y es la única enzima del Ciclo de Krebs unida a la membrana que posee un FAD unido mediante un enlace covalente a ella, que es re-oxidado por la cadena de

transporte de electrones (Voet y Voet, 1994). Por tal razón es de esperarse que se encuentre asociada a la **FGG**, donde sedimentan la mayoría de las vesículas de mitocondria y, eventualmente, junto a la **FM**, cuando se forman vesículas más pequeñas.

La PPDK ha sido detectada en los glicosomas de la mayoría de los tripanosomatidos, aunque está ausente en las formas sanguíneas de *T. brucei* (Michels y colaboradores, 2000). Esta enzima, dependiente de pirofosfato inorgánico, cataliza una reacción reversible con la producción de PEP o Piruvato. Su papel en el metabolismo intermediario de tripanosomatidos, así como la dirección de la reacción en condiciones fisiológicas no se han establecido aún. Pareciera que durante la evolución, el proceso glicolítico se volvió dependiente de ATP y la PYK reemplazó a la PPDK en la conversión de PEP en Piruvato. La PPDK debió entonces adquirir una nueva función en la célula: contribuir a mantener el balance de PPI y ATP. Esto podría ser crítico en el glicosoma donde la presencia de enzimas biosintéticas, entre ellas las asociadas a la síntesis *de novo* de esteroides, produce niveles elevados de Ppi, que la PPDK puede convertir en ATP (Urbina, 1994).

El retículo endoplasmático (caracterizado por un sistema de membranas empaquetadas) y la membrana plasmática, son organelas que al momento de la ruptura forman un conjunto heterogéneo de vesículas que sedimentan de manera diferente en el gradiente de densidad y en la centrifugación diferencial. Por ello, sus enzimas marcadoras no tendrán un patrón exclusivo de distribución.

## 6.2. Cinética e Inhibición de la actividad Escualeno Sintetasa:

### 6.2.1. Determinación de parámetros cinéticos de la enzima escualeno sintetasa:

La similitud en los valores de  $K_m$  para el FPP presentados en este trabajo y en los publicados previamente (Sasiak y Rilling, 1988; Soltis y colaboradores, 1995; Kribii y colaboradores, 1997; Thompson y colaboradores, 1997; Devarenne y colaboradores, 1998), podría ser indicativo de una fuerte conservación de las propiedades catalíticas y del sitio de unión de éste en las SQS de especies tan diferentes como humanos, ratas y tripanosomatidos. Mientras que las diferencias, incluso de hasta 10-veces mayor en los valores de  $K_m$  para el NADPH, podrían indicar una variabilidad considerable entre los sitios de unión del NADPH en diferentes especies, o diferencias en las condiciones fisiológicas de este sustrato en las diferentes organelas y/organismos.

La SQS tiene un mecanismo complejo de 2 pasos, utilizando 2 moléculas de su sustrato FPP. Se obtuvo un comportamiento lineal de los dobles inversos para la síntesis de escualeno variando las concentraciones de FPP para diferentes concentraciones fijas de NADPH tanto para la enzima de glicosomas como microsomas de *T. cruzi*. Este comportamiento ha sido publicado por Beytia y colaboradores (1973) y Agnew y colaboradores (1978) para la SQS microsomal de levadura, usando el mismo rango de concentraciones de FPP usado en este trabajo, e inicialmente lo interpretaron como indicativo de un mecanismo ping-pong (Beytia y colaboradores, 1973), pero esta sugerencia ha sido cuestionada (Agnew y colaboradores, 1978). Estudios más recientes con la forma soluble de la enzima recombinante de levadura muestran un comportamiento parabólico al graficar los doble inversos (Mooktiar y colaboradores, 1996), por lo que propusieron un mecanismo de adición secuencial de las dos moléculas de FPP, pero sólo cuando el rango de concentración se extiende por debajo de 1  $\mu$ M.

Mookhtiar y colaboradores (1996) afirman que un comportamiento lineal resultaría si la unión de la primera molécula de FPP fuera el paso limitante de la velocidad de la reacción, o en la proposición de un mecanismo ping-pong.

La hipótesis de que la unión de la primera molécula de FPP como paso limitante de la velocidad de reacción, es posible para una forma de la enzima unida a la membrana y FPP soluble en agua.

En cualquier caso, los valores de las constantes Michaelis-Menten de la enzima de *T. cruzi* son cercanos a los publicados para la enzima microsomal de levadura. Sin embargo, el comportamiento cinético obtenido en este trabajo pareciera reflejar un mecanismo de adición secuencial.

#### **6.2.2. Inhibición de SQS con BPQ-OH:**

Una gran variedad de compuestos de la familia de los ácidos zaragóxicos y bisfosfonatos y, más recientemente, las quinuclidinas han sido comprobados como inhibidores de la SQS de diferentes especies.

Lindsey y colaboradores (1995), consiguen que el ZGA-A tiene un  $K_i$  para la inactivación de la SQS de hepatocitos de rata de 0.072 nM; de hecho, se le considera el más potente inhibidor de esta enzima, inhibiéndola irreversiblemente a través de la formación de un aducto covalente.

Entre los bisfosfonatos: 1) YM175 funciona como un inhibidor no-competitivo, tiene un  $K_i$  de 57 nM y un  $IC_{50}$  de 64 nM en la enzima de hepatocitos de rata (Amin y colaboradores, 1992); 2) BM 210955 tiene un  $K_i$  de 2 nmol/L (Amin y colaboradores, 1996). Ninguno de estos compuestos ha sido probado en *T. cruzi*.

En estudio previos han sido analizadas en detalle cinéticas bifásicas para la inhibición de la SQS de mamíferos por parte de BPQ, y su derivado BPQ-OH (McTaggart y colaboradores, 1996; Ward y colaboradores, 1996); este fenómeno se atribuye a diferentes conformaciones o isoformas de la enzima, o alternativamente a la unión del inhibidor en diferentes niveles de la reacción: 1) que el BPQ-OH se asocie a la SQS después que el FPP; 2) que pueda unirse también al complejo Enzima-NADP<sup>+</sup>; 3) que se una a uno de los dos sitios de

unión del FPP en el complejo Enzima-pre-escualeno pirofosfato; o 4) que se una al complejo Enzima-escualeno ( cuando el pre-escualeno o el escualeno está unido al otro sitio de unión del farnesil).

Las constantes de inhibición ( 12 nM y 48 nM para las enzimas microsómicas y glicosómicas de *T. cruzi*, respectivamente) y su inhibición no competitiva por parte de BPQ-OH son muy similares a lo obtenido para la enzima de mamífero (McTaggart y colaboradores,1996; Ward y colaboradores,1996). Los valores de estas constantes de inhibición son 2 y 3 ordenes de magnitud mas bajos que los Kms para los sustratos de la reacción (Tabla 2). Esto sugiere que BPQ-OH, con su grupo cargado en el centro de una molécula relativamente hidrofóbica (Figura 3) puede actuar simulando carbocationes del estado de transición de la reacción.

Analizando el comportamiento cinético (similitud en los valores de Km y Vmáx para el FPP y el NADPH) de las escualeno sintetasa tanto de microsomas como de glicosoma de *T.cruzi*, así como la similitud en los valores de Ki para el BPQ-OH, podría afirmarse que ambas enzimas son iguales. De igual manera las enzimas de microsomas y glicosomas de *L. mexicana* tiene un comportamiento muy similar para las curvas de dosis-respuesta al BPQ-OH.

### **6.3. Acción de BPQ-OH contra células intactas:**

#### **6.3.1. Efecto inhibitorio de 3-(Bifenil-4-il)-3-hidroxi-Quinuclidina sobre el crecimiento de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, y promastigotes de *Leishmania mexicana*.**

Las drogas que actúan sobre enzimas de la Ruta de Síntesis de Esteroles provocan una pequeña diferenciación en el número de células/ml a partir de las 72 horas, que se hace marcada en el transcurso del tiempo. Se caracterizan además por provocar una disminución gradual de los esteroles endógenos,

donde el crecimiento de los parásitos se detiene debido a que su homólogo en las células de mamíferos, el colesterol, no puede sustituirlo de manera efectiva y viable

Los valores de  $IC_{50}$  obtenidos para *T. cruzi* fueron 43,52 y 18,92  $\mu M$  para el porcentaje de crecimiento relativo y la tasa de crecimiento relativa, respectivamente. Debido al comportamiento que provoca esta droga en el crecimiento de los epimastigotes debe considerarse lo siguiente: el valor 43,52  $\mu M$  toma en cuenta los primeros días luego de agregar la droga y donde no se ve un efecto en la proliferación de los parásitos; en cambio, el valor 18,92  $\mu M$  calculado a partir de la tasa de crecimiento relativa de las últimas 48 horas del ensayo, reflejó mejor el comportamiento del BPQ-OH, puesto que a este nivel ejerce su acción de manera efectiva.

Para *T. cruzi*, la mayoría de las células tratadas presentaban forma ovalada y eran prácticamente inmóviles; mientras que las células control tenían apariencia y motilidad normales.

En el ensayo, en que se mide el efecto del BPQ-OH en el cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* a través de 3 métodos, podemos llegar a lo siguiente: analizando comparativamente el efecto del BPQ-OH en las curvas de crecimiento, se refleja mejor a través de la medición de la actividad esterasa, ya que es una medida de la viabilidad celular, así como el conteo de las células diariamente en el cultivo. La curva de D.O. refleja en menor grado la muerte de los parásitos en el cultivo, posiblemente debido a que en el transcurso del tiempo, las células excretan al medio desechos y productos de su metabolismo, que alteran la turbidez del medio, afectando los valores que emite el espectrofotómetro.

En *L. mexicana* se produce el mismo comportamiento, ya que durante las primeras 24 horas no hay diferenciación en la proliferación de los promastigotes para las diferentes concentraciones de BPQ-OH y es a las 48 horas que se hace notable la carencia de los lípidos, lo cual afecta la división celular.

Los valores de  $IC_{50}$  para *L. mexicana* fueron 16,93 y 11,91  $\mu M$  para el porcentaje de crecimiento relativo y la tasa de crecimiento relativa,

respectivamente. Igual que para *T. cruzi*, el valor obtenido a partir de la tasa de crecimiento relativo, 11,91  $\mu\text{M}$ , refleja mejor el efecto de la droga, puesto que no toma en cuenta las primeras 24 horas en las que la droga no produce efecto en la proliferación normal de los promastigotes.

Para *L. mexicana*, las células tratadas presentando apariencia ovalada y poca motilidad; mientras las células control tuvieron apariencia y motilidad normal.

En *T. cruzi* los efectos antiproliferativos comenzaron a notarse 72 horas después de agregar la droga. En tanto que para *L. mexicana* éste se produjo más temprano, a las 48 horas. Esto se debe a que el ciclo de división celular es mucho más corto para las leishmanias, siendo de aproximadamente 12 horas; mientras que para *T. cruzi* es de 24 horas.

Las alteraciones morfológicas tanto de epimastigotes de *T. cruzi* como de promastigotes de *L. mexicana*, así como la disminución en la motilidad de éstos captadas por microscopia de luz en este trabajo son soportadas por estudios de ultraestructura realizados anteriormente para otros Inhibidores de la Biosíntesis de Esteroles.

Entre algunas de las alteraciones subcelulares inmediatas observadas tanto en *T. cruzi* como diferentes especies del género *Leishmania* se cuentan: condensación anormal de la cromatina, aparición de grandes depósitos electrón-densos en el citoplasma, y muchas células binucleadas, indicativo de la detención de la citoquinesis. Luego de más tiempo de exposición a las drogas se observa un inflamamiento del mitocondrion (en células normales esta organela ocupa aproximadamente el 12% del volumen celular, y en células tratadas puede alcanzar hasta el 80% del volumen), con la pérdida de la organización de la membrana interna, y la desaparición de cuerpos electrón-densos en la matriz; lo cual conlleva a la lisis celular (Lazardi y colaboradores, 1990; Lazardi y colaboradores, 1991; Rodríguez y colaboradores, 2002).

La noción de que el ergosterol (*T. cruzi*) o el 5-dehidro-episterol (*Leishmania*) están involucrados en la función mitocondrial de estos parásitos se soporta por 2 importantes evidencias. 1) Los efectos de estas drogas en el

crecimiento, morfología y ultraestructura de la célula se pueden revertir con la presencia de ergosterol exógeno, pero no colesterol (Larralde y colaboradores, 1988). 2) Turnes y colaboradores (1988) encuentran que en epimastigotes de *T. cruzi*, el ergosterol y esteroides 5,7-dienicos están concentrados en fracciones típicas de la membrana plasmática, pero están también asociados a aquellas fracciones subcelulares que contienen SDH (marcador de la membrana interna mitocondrial). Esto contrasta con la composición lipídica de la membrana interna mitocondrial de vertebrados y plantas, las cuales son típicamente carentes de esteroides (Rouser y colaboradores, 1968).

**Tabla 6.** Valores de IC<sub>50</sub> y MIC para diferentes IBE<sup>a</sup> y análogos de lisofosfolípidos<sup>b</sup> sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*<sup>f</sup> y promastigotes de Leishmania.

Droga	IC <sub>50</sub>	MIC
BPQ-OH <sup>a</sup>	19 μM <sup>c</sup> 12 μM ( <i>L. mexicana</i> NR)	30 μM <sup>c</sup> 30 μM ( <i>L. mexicana</i> NR)
D0870 <sup>a</sup>	100 nM <sup>c</sup>	--
SCH 56592 <sup>a</sup>	--	30 nM <sup>c</sup>
UR-9825 <sup>a</sup>	30 nM <sup>c</sup>	--
Ketoconazol <sup>a</sup>	--	5 μM ( <i>L. brasiliensis</i> ) 15 μM ( <i>L. mexicana</i> NR)
ICI 195,739 <sup>a</sup>	--	0.1 μM <sup>c</sup>
22,26 azasterol <sup>a</sup>	--	10 μM <sup>c</sup>
Et-18-OCH <sub>3</sub> <sup>b</sup>	3 μM <sup>c</sup>	--
Miltefosina <sup>b</sup>	1 μM <sup>c</sup>	--
Ilmofosina <sup>b</sup>	3 μM <sup>c</sup>	--

En la Tabla 6 se comparan los valores de IC<sub>50</sub> y MIC para diferentes drogas con efecto antiparasítico. Los valores para BPQ-OH sobre *T. cruzi* son altos en comparación a los otros encontrados en la tabla, siendo en algunos casos 3 ordenes de magnitud mayores para el IC<sub>50</sub> respecto al encontrado para UR-9825 (Urbina y colaboradores, 2000). El valor de MIC para BPQ-OH llega a ser hasta 1000 veces mayor que el encontrado para SCH 56592 (Urbina y colaboradores, 1998).

En *Leishmania mexicana* igualmente se encuentra que el MIC para BPQ-OH es alto respecto a los encontrados para ketoconazol (2 veces mayor), mientras que es 6 veces mayor que el reportado para *Leishmania brasiliensis* con ketoconazol (Lazardi y colaboradores, 1990).

Pareciera que hay un problema en la permeabilidad de la droga a través de la membrana de estos parásitos, sobre todo si se toma en cuenta que actúan a concentraciones muy bajas sobre la enzima *in vitro*.

### **6.3.2. Efecto de BPQ sobre la síntesis de novo de esteroides en epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. mexicana*:**

Las diferencias existentes entre el ergosterol y el colesterol son: la presencia de un grupo metil en el carbono 24 del ergosterol; la presencia de insaturaciones nucleares (posición 5 y 7) y en la cadena lateral (posición 22), en el ergosterol; mientras que el colesterol sólo tiene una insaturación nuclear en la posición 5.

A pesar de que estas diferencias pueden parecer pequeñas, el colesterol no puede sustituir al ergosterol en la membrana de estos organismos.

El ergosterol, así como los demás esteroides, interactúa con los fosfolípidos para mantener la fluidez óptima de la membrana, así como su integridad en condiciones ambientales cambiantes. Una composición sub-óptima de esteroides de la membrana puede ocasionar un incremento en la permeabilidad de electrolitos (Block, 1983).

El ergosterol posee dos funciones principales en la membrana: a) función estructural, asociado con los grupos acílicos de los fosfolípidos, para promover un estado de movilidad apropiado que mantiene las propiedades de selectividad y permeabilidad de la membrana; y b) un rol metabólico o regulatorio, en el que pequeñas cantidades de esteroles asociado con estructuras específicas puede requerirse para el desempeño de actividades enzimáticas asociadas a la regulación del crecimiento y desarrollo (Beach y colaboradores, 1988).

Rodriguez y colaboradores (1986) propusieron 4 papeles funcionales del ergosterol: "Sparking" (capacidad de soportar y/o disparar el crecimiento); "Dominio crítico" (debido a que es requerido sólo en áreas restringidas de la membrana); "Dominio" (cuando se encuentra en condiciones mínimas requeridas para el crecimiento celular y biosíntesis de la membrana); y "Bulk" (mantenimiento de la fluidez óptima de la membrana).

Estas funciones son altamente dependientes del grupo metil en el carbono 24, puesto que sustituciones del grupo a-metil por 24-B-metil y 24-B-etil no pueden ejercer su función.

Los resultados presentados en las Tablas 4 y 5 indican una reducción dosis dependiente de la proporción de esteroides endógenos/exógenos (Figura 28), sin acumulación de escualeno, lo cual es consistente con el bloqueo de la biosíntesis de esteroides a nivel de la SQS.

Estos resultados son de un gran interés, siendo la primera demostración del efecto del BPQ-OH en la biosíntesis de esteroides en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*, ya que en ambos casos el decrecimiento en la producción de esteroides endógenos causado por el BPQ-OH es prácticamente suficiente para detener el crecimiento de los parásitos, lo que puede comprobarse al observar el número de células / ml al finalizar el ensayo para las concentraciones mayores, y los controles.

### 6.3.3. Efecto de la 3-(Bifenil-4-il)-3-hidroxi-Quinuclidina sobre la proliferación de amastigotes de *T. cruzi*:

Un hecho importante en este ensayo es que las diferentes concentraciones de BPQ-OH probadas no tienen efectos tóxicos en las células hospedadoras, puesto que no se observa desprendimiento o lisis celular. De hecho, la apariencia de las células Vero permanece normal, lo cual se comprueba al comparar la apariencia de las células sin tratar con BPQ-OH (control) con aquellas tratadas con las diferentes concentraciones de BPQ-OH. Además, el número total de células / campo permanece constante para las diferentes concentraciones de la droga.

Es remarcable que el BPQ-OH fue capaz de erradicar los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* sin producir efectos nocivos en las células Vero, a pesar de estar inhibiendo también la SQS de éstas. Tales resultados se deben probablemente a la capacidad de las células hospedadoras de compensar el bloqueo de la síntesis de colesterol por la expresión de receptores LDL, y por tanto tomando el colesterol del medio de cultivo (Goldstein y Brown, 2001). En contraste, no hay para el parásito manera de compensar el bloqueo de la biosíntesis de ergosterol inducido por BPQ-OH, ya que no hay cantidades apreciables de ergosterol en la célula hospedadora ni en el medio de cultivo.

El valor de  $IC_{50}$  obtenido en este trabajo para el BPQ-OH en amastigotes intracelulares es 2.98  $\mu M$ .

**Tabla 7.** Valores de MIC para diferentes IBE<sup>a</sup> y Análogos de lisofosfolípidos<sup>b</sup> sobre la proliferación de amastigotes de *Trypanosoma cruzi* cultivados en células Vero.

Drogas	MIC
BPQ-OH <sup>a</sup>	25 $\mu$ M
SCH 56592 <sup>a</sup>	0.3 nM
D0870 <sup>a</sup>	10 nM
UR-9825 <sup>a</sup>	10 nM
ICI 195,739 <sup>a</sup>	100 nM
Et-18-OCH <sub>3</sub> <sup>b</sup>	0.1 $\mu$ M
Miltefosina <sup>b</sup>	0.1 $\mu$ M
Ilmofosina <sup>b</sup>	1 $\mu$ M

En la Tabla 7 se comparan los valores de MIC para diferentes IBE y análogos de lisofosfolípidos sobre la proliferación de amastigotes de *T. cruzi*. Los valores para el BPQ-OH son bastante altos comparados con otros IBE, siendo hasta 4 ordenes de magnitud mayor que para el SCH 56592, el más potente; mientras que comparado con los análogos de lisofosfolípidos (Lira y colaboradores, 2001) es 2 ordenes de magnitud mayor.

Si se comparan los valores de IC<sub>50</sub> y MIC para diversos compuestos con actividad antiproliferativa de amastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*, se consigue siempre que las formas intracelulares muestran mayor susceptibilidad a dichas drogas. Liendo y colaboradores (1999) han propuesto sobre la base de estudios bioquímicos detallados, que la gran susceptibilidad de amastigotes intracelulares de *T. cruzi* a inhibidores de la biosíntesis de esteroides se debe a su pequeño banco de esteroides preformados. Rodríguez y colaboradores (2002) consiguen el mismo fenómeno con promastigotes y amastigotes de *Leishmania amazonensis* tratados con 22,26 azasterol .

## **7. CONCLUSIONES:**

- La enzima SQS en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* tiene una ubicación dual, coincidiendo con los marcadores glicosomales y microsomales/mitocondriales en las diferentes fases de crecimiento. En promastigotes de *Leishmania mexicana*, la enzima SQS presenta ubicación similar coincidiendo con los marcadores glicosomales, microsomales/mitocondriales en fase exponencial.
- Los parámetros cinéticos obtenidos para las enzimas microsómicas y glicosómicas de *T. cruzi* son comparables a los de vertebrados y levaduras.
- BPQ-OH se comporta como un inhibidor no-competitivo en las enzimas de glicosoma y microsoma de *Trypanosoma cruzi*, con valores de  $K_i$  de 48 y 12 nM, respectivamente. Posiblemente, este compuesto tienen más de un sitio de unión a la enzima. Se presume que actúa sobre ésta imitando intermediarios carbocatiónicos del mecanismo de reacción
- BPQ-OH produce una inhibición bifásica en las SQS de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*.
- La inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *Leishmania mexicana* por BPQ-OH está asociada al bloqueo de la síntesis de esteroides a nivel de pre-escualeno.
- BPQ-OH tiene un efecto selectivo sobre los amastigotes de *T. cruzi* aunque se ha reportado que también inhibe la SQS de las células hospedadoras, que pueden compensar el bloqueo de la síntesis de colesterol a través de la expresión de receptores LDL y tomando el colesterol del medio de cultivo.
- Los resultados de este trabajo demuestran por primera vez que inhibidores de la SQS pueden eventualmente actuar como agentes antiparasitarios selectivos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA:

**Aboushadi N and Krisans SK** (1998). Analysis of isoprenoid biosynthesis in peroxisomal - deficient Pex2 CHO cell-lines. *J. Lipid Res.*39: 1781-1791.

**Aman RA and Wang CC** (1987). Identification of two glycosomal membrane proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25: 83-92.

**Amin D, Cornell SA, Gustafson SK, Needle SJ, Ullrich JW, Bilder GE, and Perrone MH** (1992). Bisphosphonates used for the treatment of bone disorders inhibit squalene synthase and cholesterol biosynthesis. *J.Lipid Res.* 33: 1657-1663.

**Amin D, Cornell SA, Perrone MH, and Bilder GE** (1996). 1-Hydroxy-3-(methylpentylamino) – propylidene - 1,1 - bisphosphonic Acid as a Potent Inhibitor of Squalene Synthase. *Arzneim-Forsch. /Drud Res.* 46: 759-762.

**Appelkvist EL, Reinhart M, Fisher R, Billheimer J and G Dallner** (1990). Presence of individual enzymes of cholesterol biosynthesis in rat liver peroxisomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 282: 318-325.

**Baxter A, Fitzgerald BJ, Hutson JL, McCarthy AD, Motteram JM, Ross BC, Saprà M, Snowden MA, Watson NS, Williams RJ, and Wright C** (1992). Squalastatin 1, a Potent Inhibitor of Squalene Synthase, Which Lowers Serum Cholesterol in Vivo. *J. Biol. Chem.* 267: 11705-11708.

**Bergmeyer HU** (1983). *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press.

**Bergstrom JD, Dufresne C, Bills GF, Nallin-Omstead M, and Byrne K** (1995). Discovery, Biosynthesis, and Mechanism of Action of the Zaragozic Acids:

Potent Inhibitors of Squalene Synthase. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 607-639.

**Bordier C** (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256: 1604-1607.

**Brown GR, Clarke DS, Foubister AJ, Freeman S, Harrison PJ, Johnson MC, Mallion KB, McCormick J, McTaggart F, Reid AC, Smith GJ, and Taylor MJ** (1996). Synthesis and Activity of a Novel Series of 3-Biarylquinuclidine Squalene Synthase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 39: 2971-2979.

**Burleigh BA, and NW Andrews** (1995). The mechanism of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cell. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 175-200.

**Camargo E** (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic *Trypanosoma* in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 6: 93-100.

**Ciosek CP, Magnin DR, Harrity TW, Logan JVH, Dickson JK, Gordon EM, Hamilton KA, Jolibois KG, Kunselman LK, Lawrence RM, Mookhtiar KA, Rich LC, Slusarchyk DA, Sulsky RB, and Biller SA** (1993). Lipophilic 1,1-Bisphosphonates are potent Squalene Synthase inhibitors and orally active Cholesterol Lowering agents *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 268: 24832-24837.

**Concepción JL, Chataing B, Dubourdieu** (1999). Purification and properties of phosphoglucose isomerases of *Trypanosoma cruzi*. *CBP Part B* 122: 211-222.

**Concepción JL, Gonzalez-Packanowska D and Urbina JA** (1998). 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA Reductase in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: Subcellular Localization and Kinetic Properties. *Arch. Biochem. Biophys.*

352:114-120.

**Croft, S.L.** (1988). Recent developments in the chemotherapy of leishmaniasis. *Trends Pharmacol. Sci.* 9: 376-381

**Croft, S.L., J.A. Urbina, and R. Brun** (1997). Chemotherapy of human leishmaniasis and trypanosomiasis, p 245-257. In G. Hide, J.C. Mottram, G.H. Combs, and P.H. Holmes (ed), Trypanosomiasis and leishmaniasis. CAB International, London.

**Devarenne TP, Shin DH, Back K, Yin S, and Chappell J** (1998). Molecular Characterization of Tobacco Squalene Synthase and Regulation in Response to Fungal Elicitor. *Arch. Biochem. Biophys.* 349: 205-215.

**De Walque, Stéphane** (2000). Signals and proteins involved in sorting of Glycolytic enzymes to glycosomes in Trypanosomatidae. Thesis presented to obtain a Doctorate degree in Biochemical Sciences. Université catholique de Louvain.

**Ericsson J, Appelkvist E, Theli A, Chojnacki T, and Dallner G** (1992). Isoprenoid Biosynthesis in Rat Liver Peroxisomes. Characterization of *cis*-Prenyltransferase and Squalene Synthase. *J.Biol.Chem.* 267: 18708-18714.

**Glodstein JL, and Brown MS** (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 343: 425-430.

**Glodstein JL, and Brown MS** (2001). The Cholesterol Quartet. *Science* 292: 1310-1312.

**González – Pacanowska D, Arison B, Havel CM, and Watson JA** (1988). Isoprenoid synthesis in isolated embryonic *Drosophila* Cells. *J. Biol. Chem.*

263: 1301-1306.

**Hata S, Sanmiya K, Kouchi H, Matsuoka M, Yamamoto N, and Izui K** (1997). cDNA Cloning of Squalene Synthase Genes from Mono - and Dicotyledonous Plants, and Expression of the Gene in Rice. *Plant Cell Physiol.* 38 (12): 1409-1413.

**Herwaldt, B., and J.D. Berman** (1992). Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and view of pertinent clinical studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 296-306.

**Hiyoshi H, Yanagimachi M, Ito M, Ohtsuka I, Yoshida I, Saeki T, and Tanaka H** (2000). Effect of ER - 27856, a novel squalene synthase inhibitor, on plasma cholesterol in rhesus monkeys: comparison with 3-hydroxy-3-methylglutaryl - CoA reductase inhibitors.. *J. Lipid Res.* 41: 1136-1144.

**Keller RK** (1996). Squalene synthase inhibition alters metabolism of nonsterols in rat liver. *Biochem. Biophys. Acta.* 1303: 169-179.

**Kinne R and G Sachs** (1985). Isolation and characterization of biological membranes. *Methods for studying Membranes. Part II. Chapter 5.*

**Kribii R, Arró M, Del Arco A, González V, Balcells L, Delourme D, Ferrer A, Karst F, and Boronat A** (1997). Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* SQS1 gene encoding squalene synthase. Involvement of the C-terminal region of the enzyme in the channeling of squalene through the sterol pathway. *Eur. J. Biochem.* 249: 61-69.

**Krisans, SK** (1992). The role of peroxisomes in cholesterol metabolism. *Amer. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 7:358-364.

- Köler P and R Bachman** (1980). *Mol. Biochem. Parasitol.* 1:75-90.
- Larralde G, Vivas J, and J.A. Urbina** (1988). Concentration and time dependance of the effects of ketoconazole on growth and sterol synthesis by *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes. *Acta Cient. Venez.* 39:140-146.
- Lazardi K, Urbina JA, and W de Souza** (1990). Ultrastructural alterations induced by two Ergosterol Biosíntesis Inhibitors, Ketoconazole and Terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizitrypanum) cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 2097-2105.
- Lazardi K, Urbina JA, and W de Souza** (1991). Ultrastructural alterations Induced by ICI 195,739, a bis-triazole derivative with strong antiproliferative action against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 736-740.
- Liendo A, Lazardi K, and J.A. Urbina** (1998). Antiproliferative effects and mechanism of action of D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*. *J. Antimicrob. Chemother.* 41:197-205.
- Liendo A, Visbal G, Piras MM, Piras R, Urbina JA** (1999). Sterol composition And biosynthesis in Trypanosome cruzi amastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 000: 1-11.
- Lindsey S, and Harwood HJ** (1995). Inhibition of Mammalian Squalene Synthase Activity by Zaragozic Acid A Is a Result of Competitive Inhibition Followed by Mechanism-based Irreversible Inactivation. *J. Biol. Chem.* 270: 9083-9096.
- Lira R, Contreras LM, Santa Rita RM, and Urbina JA** (2001). Mechanism of

action of anti – proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 537-546.

**Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and RJ Randall** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275

**Martin MB, Arnold W, Health III HT, Urbina JA** (1999). Nitrogen-Containing Bisphosphonates as Carbocation Transition State Analogs for Isoprenoid Biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26: 754-758.

**Martin MB, Grimley JS, Lewis JC, Heath HT, Bailey BN, Kendrick H, Yardley V, Caldera A, Lira R, Urbina JA, Moreno SNJ, Docampo R, Croft S, and Oldfield E** (2000). Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*: a potencial route of chemotherapy. Submitted to *J. Med. Chem.*

**McTaggart F, Brown GR, Davidson RG, Freeman S, Holdgate GA, Mallion KB, Mirrlees DJ, Smith GJ, and Ward W** (1996). Inhibition of squalene synthase of rat liver by novel 3' substituted Quinuclidines. *Biochem. Pharmacol.* 51: 1477-1487.

**Michels PAM, Hannaert, and Bringaud F** (2000). Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae – New data and Views. *Parasitology Today.* 6: 482-488.

**Mookhtiar KA, Kalinowski SS, Zhang D, and Poulter CD** (1994). Yeast squalene synthase. A mechanism for addition of substrates and activation

by NADPH. *J. Biol. Chem.* 269: 11201-11207.

**Olliaro, P.L., and A.D.M. Bryceson** (1993). Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitology Today* 9: 323-328.

**Opperdoes FR and P Borst** (1977). Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: The Glycosome. *FEBS Lett.* 80:360-364.

**Opperdoes FR, Markos A and RF Steiger** (1981). Localization of malate dehydrogenase, adenylate kinase and glycolytic enzymes in glycosomes and the threonine pathway in the mitochondrion of culture trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 4: 291-309.

**Opperdoes FR, Baudhuin P, Coppens I, De Roe C, Edwards SW, Weijers PJ, And Misset O** (1984). Purification, Morphometric Analysis, and Characterization of the Glycosomes (Microbodies) of the Protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.* 98: 1178-1184.

**Pinto Dias, J.C.** (1992). Epidemiology of Chagas disease. In: Wendel S, Brener Z, Camargo M E, Rassi A (eds) Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. *ISBT Brasil, Sao Paulo*, pp 49-80.

**Pinto WJ, and Nes WR** (1983). Stereochemical specificity for sterol In *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 258: 4472-4476.

**Ponpipom MM, Girotra NN, Bugianesi RL, Roberts CD, Berger GD, Burk RM, Marquis RW, Parsons WH, Bartizal KF, Bergstrom JD, Kurtz MM, Onishi JC, and Rew DJ** (1994). Structure-Activity Relationships of C1 and C6 Side

- Chains of Zaragozic Acid A Derivates. *J. Med. Chem.* 37:4031-4051.
- Poulter CD** (1990). Biosynthesis of non-head-to-tail terpenes. Formation of 1'-1 and 1'-3 linkages. *Acc. Chem. Res.* 23: 70-77.
- Rangel H, Dagger F, Hernandez A, Liendo A, and J.A. Urbina** (1996). Naturally azole-resistant *Leishmania braziliensis* promastigotes are rendered susceptible in the presence of Terbinafine: comparative study with azole-susceptible *Leishmania mexicana* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 : 2785-2791.
- Rodríguez JCF, Attias M, Rodriguez C, Urbina JA, and W de Souza** (2002). Ultrastructural and Biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a  $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 : 487-499.
- Rouser G, Nelson GJ, Fleischer S, and G Simon** (1968). Lipid composition of animal cell membranes, organelles, and organs, p 5-69. In D. Chapman (ed), Biological membranes. Academic Press, Inc. (London), Ltd., London.
- Sasiak K, and Rilling HC** (1988). Purification to homogeneity and some properties of squalene synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 260: 622-627.
- Scott DA, de Souza W, Binchamol M, Zhong L, Lu HG, Moreno SNJ, and Docampo R** (1998). Presence of a Plant-like Proton-pumping Pyrophosphatase in Acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 273: 22151-22158.
- Soltis DA, McMahon G, Caplan SL, Dudas DA, Chamberlin HA, Vattay A, Dottavio D, Rucker ML, Engstrom RG, Cornell-Kennon SA, and**

- Boettcher BR** (1995). Expression, Purification, and Characterization of the Human Squalene Synthase: Use of Yeast and Baculoviral Systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 316: 713-723.
- Stamellos KD, Shackelford JE, Shechter I, Jiang G, Conrad D, Keller GA, And Krisans SK** (1993). Subcellular localization of squalene synthase in rat hepatic cells. Biochemical and immunochemical evidence. *J. Biol. Chem.* 268: 12825-12836.
- Steiger RF, Oppendoes FR, and Bontemps J** (1980). Subcellular Fractionation of *Trypanosoma brucei* Bloodstream Forms with Special Reference to Hydrolases. *Eur. J. Biochem.* 105: 163-175.
- Tait RM** (1992). Development of a Radiometric Spot-Wash Assay for Squalene Synthase. *Anal. Biochem.* 203: 310-316.
- Tanimoto T, Ohya S, and Tsujita Y** (1998). Inhibitory Activity to Protein Prenylation and Antifungal Activity of Zaragozic Acid D3, a Potent Inhibitor of Squalene Synthase Produced by the Fungus, *Mollisia* sp. SANK 10294. *J. Antibiot.* 51: 428-431.
- Taylor MB and WE Gutteridge** (1987). *Trypanosoma cruzi* subcellular distribution of glycolytic and some related enzymes of epimastigotes. *Exp. Parasitol.* 63: 84-97.
- Thompson JF, Danley DE, Mazzalupo S, Milos PM, Lira ME, and Harwood HJ** (1998). Truncation of Human Squalene Synthase Yields Active, Crystallizable Protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 350: 283-290.
- Turnes JF, Boveris A, Gros EG, and AOM Stoppani** (1980). Distribución subcelular de ergosterol y esteroides 5,7-dienicos en *Trypanosoma cruzi*.

*Medicina* 40:137-144.

**Urbina JA** (1987). The phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* epimastigotes: molecular, kinetic and regulatory properties. *Arch Biochem Biophys.* 258: 186-95.

**Urbina JA** (1994). Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today.* 10: 107-110.

**Urbina JA** (1997). Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* 114: S91-S99.

**Urbina JA** (1999). Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *J. Mol. Med.* 77: 332-338.

**Urbina JA** (1999). Parasitological Cure of Chagas Disease: Is it Possible? It is Relevant?. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 94: 349-355.

**Urbina JA** (2000). Sterol biosynthesis inhibitor for Chagas' disease. *Curr. Op. Anti-infect. Inv. Drugs* 2 (1): 40-46.

**Urbina JA, Lira R, Visbal G, and J Bartrolí** (2000). In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2498-2502.

**Urbina JA, Moreno B, Vierkotter S, Oldfield E, Payares G, Sanoja C, Bailey BN, Yan W, Scott DA, Moreno SNJ, and Docampo R** (1999). *Trypanosoma cruzi* Contains Major Pyrophosphate Stores, and Its Growth in Vitro and in Vivo Is Blocked by Phyrophosphate Analogs. *J. Biol. Chem.* 274: 33609-33615.

**Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Piras R, Perez N, Wincker P, and Loebenberg** (1998). Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: In vitro and in vivo studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1771-1777.

**Urbina JA, Payares G, Molina J, Sanoja C, Liendo A, Lazardi K, Piras M, Piras R, Perez N, Wincker P, and Ryley JF** (1996). Cure of short- and long-term experimental chagas' Disease using D0870. *Science.* 273: 969-971.

**Vigar Z** (1979). Atlas de Parasitología Clínica. Medicina Panamericana Editorial, S.A. España.

**Vivas J** (1996). Inhibidores de la 24(25) Esterol Metil Transferasa (E.C.2.1.1.43): Una Alternativa Racional para la Quimioterapia de la Enfermedad de Chagas. Tesis Doctoral, Universidad Central de Venezuela. Caracas.

**Voet D and J Voet** (1994). Biochemistry. Second Edition. John Wiley & Sons, INC.

**Ward WHJ, Holdgate GA, Freeman S, McTaggard F, Girdwood PA, Davidson RG, Mallion KB, Brown GR, and Eakin MA** (1996). Inhibition of squalene synthase *in vitro* by 3-(Biphenyl-4-yl)-Quinuclidine. *Biochem. Pharmacol.* 51: 1489-1501.

**Watson NS, and Procopiou PA** (1996). 7 Squalene synthase inhibitors: their potential as hypocholesterolaemic agents. *Prog. Med. Chem.* 33: 331-378.

**Zweytick D, Hrastnik C, Kohlwein SD, and Daum G** (2000). Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, Erg4p, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS*. 470: 83-87.