



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



**EFFECTO DE LA SIMVASTATINA[®] SOBRE LA
CONCENTRACIÓN DE LÍPIDOS NEUTROS DE *Trypanosoma
evansi* EN ANIMALES EXPERIMENTALES.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller **Xochilt Sucre Masea** como requisito parcial para optar por el título de **Licenciada en Biología.**

Tutor: **Dr. Alfredo Mijares**

Asesora Académica: **Profa. Guillermina Alonso**

CARACAS, VENEZUELA
OCTUBRE, 2012

Dedicada con amor...

A Dios, mi fé y mi fuerza

A mi familia, mis columnas, mis consejeros y apoyo incondicional

A mis amigos, mi segunda familia

A Héctor, mi soporte y aliento en cada momento de crisis

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios, por todas las oportunidades, la voluntad y la fuerza para iniciar y terminar esta maravillosa etapa de mi vida.

A mis padres (los 4) por todo el amor, apoyo, comprensión y consejos dados durante toda mi vida, porque son la base de lo que soy. A mi mamá y a Elio por todas las facilidades que me dieron en toda la carrera, por todas las veces que me subieron al IVIC, hasta los fines de semana!.

A mi familia, por entender esos momentos de abandono, especialmente en la recta final, y por todo el amor que me expresan a pesar de todo, los amo.

Al Dr Alfredo, por la oportunidad, la experiencia, la sabiduría, la guía, el cariño y la confianza que me ha brindado.

A la Dra Trina, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y la confianza que me brindó en su momento. Siempre la recuerdo.

A la Profa. Mina, por la sabiduría y consejos impartidos tanto en el salón de clases como en su asesoría en la revisión y defensa de este trabajo.

A Ari, por entrenarme tan bien al entrar al laboratorio, por haber confiado en mí desde el principio y por la ayuda brindada en mis experimentos.

A Eva y Adri por hacer más amena esta experiencia, por escucharme, por entenderme.

A Meye, por TODO el apoyo y la ayuda brindada en la realización de este trabajo, tanto en los experimentos como en la escritura del mismo, por siempre escuchar mi quejas, aconsejarme y no obstinarse con ellas.

A mis hermanitas Adri y Pam, por siempre estar ahí en los momentos más duros, por todas las traspasadas de apoyo, por todas las comidas preparadas cuando estaba full de trabajo (en este aspecto también le agradezco muchísimo a sus familias), por las distracciones justo antes de estallar de estrés, por todo chicas, porque sin ustedes el camino hubiese sido mucho más difícil de transitar, las amo!

A mis queridas Maye y Emi, por todos esos momentos de estudio que me ayudaron a despejar tantas dudas y por acompañarme de cerca en todo este proceso! Gracias por su entendimiento, por siempre estar dispuestas a desestresarnos y por acompañarme en la loca novela que ha sido nuestra carrera, las adoro!!!

Al amor de mi vida, Hector, por el amor, apoyo y comprensión desde el principio, porque aunque lejos siempre estuviste apoyándome, siempre entendiste mis ausencias y me ayudaste en cada una de mis crisis obligándome a mantener la perspectiva y a seguir adelante. Porque cada vez que perdía los ánimos encontrabas esa forma única de animarme, porque siempre pude y puedo contar contigo. Te amo.

Y a todas esas personas que han estado conmigo y me han ayudado en este maravilloso camino! Nany, An, Daz, Dani, Fari, Ruth, Vicky, Ale, Nelson, Greg, JC, JV, Romel, Hector... Gracias a toodoos!

I. ÍNDICE DE CONTENIDO

| | Pág |
|---|-----|
| I. INDICE DE CONTENIDO | i |
| II. INDICE DE FIGURAS | iii |
| III. ÍNDICE DE TABLAS | iv |
| IV. LISTA DE ABREVIATURAS | v |
| V. RESUMEN | vi |
| 1. INTRODUCCIÓN | |
| 1.1 Familia Trypanosomatidae | 1 |
| 1.2 <i>Trypanosoma evansi</i> y la tripanosomosis animal | 2 |
| 1.3 Colesterol | 5 |
| 1.4 Lipoproteínas Plasmáticas | 7 |
| 1.5 Estatinas: Simvastatina [®] | 8 |
| 2. ANTECEDENTES | |
| 2.1 Estudios a nivel internacional | 10 |
| 2.2 Estudios a nivel nacional | 13 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 14 |
| 4. OBJETIVOS | |
| 4.1 Objetivo General | 15 |
| 4.2 Objetivos Específicos | 15 |
| 5. PLAN DE TRABAJO | 16 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | |
| 6.1 Cepa | 17 |
| 6.2 Animales Experimentales | 17 |
| 6.3 Tratamiento | 17 |
| 6.4 Grupos Control | 18 |
| 6.5 Monitoreo de la Parasitemia | 19 |
| 6.6 Purificación de <i>Trypanosoma evansi</i> | 21 |
| 6.7 Fijación de parásitos | 23 |
| 6.8 Tinción con Filipina y Rojo de Nilo | 23 |
| 6.9 Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas | 24 |
| 6.10 Obtención de plasma sanguíneo de los animales experimentales | 25 |

I. ÍNDICE DE CONTENIDO

| | Pág |
|--|------------|
| 6.11 Determinación de colesterol total (CT) en plasma | 25 |
| 6.12 Determinación de Lipoproteínas del plasma | 26 |
| 6. 13 Procesamiento estadístico | 27 |
| 7. RESULTADOS | 28 |
| 8. DISCUSIÓN | 41 |
| 9. CONCLUSIONES | 49 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA | 51 |
| 11. APÉNDICES | 57 |

I. ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág |
|--|-----|
| 1. Esquema detallado de <i>Trypanosoma evansi</i> ----- | 1 |
| 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma evansi</i> ----- | 3 |
| 3. Estructura química del colesterol ----- | 5 |
| 4. Vía de síntesis de colesterol y ergosterol ----- | 6 |
| 5. Esquema general de la estructura de las lipoproteínas ----- | 7 |
| 6. Estructura química de la Simvastatina® ----- | 9 |
| 7. Gráfico para estimar parasitemias de tripanosomas mediante el método de Herbert y Lumsden (1976) ----- | 19 |
| 8. Detalle de la rejilla de una Cámara de Neubauer ----- | 20 |
| 9. Sobrevida ----- | 29 |
| 10. Parasitemia promedio mediante el método de Herbert y Lumsden (1976) ----- | 29 |
| 11. Niveles de colesterol total, HDL y LDL en plasma de los animales en estudio ----- | 31 |
| 12. Parásitos purificados de sangre de animales infectados experimentalmente con <i>Trypanosoma evansi</i> , tratados o no con Simvastatina®, teñidos con Filipina ----- | 34 |
| 13. Parásitos purificados de sangre de animales infectados experimentalmente con <i>Trypanosoma evansi</i> , tratados o no con Simvastatina®, teñidos con Rojo de Nilo ----- | 35 |
| 14. Parásitos purificados de sangre de animales infectados experimentalmente con <i>Trypanosoma evansi</i> , teñidos con Filipina y Rojo de Nilo ----- | 36 |
| 15. Concentración de colesterol en parásitos purificados de sangre de animales infectados experimentalmente tratados y no tratados con Simvastatina®, determinado por cromatografía de gases ----- | 38 |
| 16. Cromatograma de la fracción de esteroides extraída de parásitos purificados del grupo control ----- | 38 |
| 17. Cromatograma de la fracción de esteroides extraída de parásitos purificados del grupo infectados + droga ----- | 39 |
| 18. Cromatograma control (corrida de los solventes empleados en la extracción de esteroides) ----- | 39 |
| 19. Cromatogramas del patrón de colesterol empleado para la cuantificación del compuesto en las fracciones de esteroides extraídas de parásitos purificados de los grupos control infectados e infectados + droga ----- | 40 |
| 20. Parasitemia promedio mediante el conteo por cámara de Neubauer ----- | 59 |

II. ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág |
|---|-----|
| 1. Porcentaje de las lipoproteínas de alta y baja densidad (HDL y LDL respectivamente) con respecto al colesterol total en plasma de los animales experimentales de cada grupo determinada diariamente una vez realizada la infección e iniciado el tratamiento con Simvastatina® | 32 |
| 2. Prueba estadística ANOVA de una vía con $P < 0,05$, sobre los datos de sobrevida de los animales experimentalmente infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> tratados y no tratados con Simvastatina® | 57 |
| 3. Prueba de comparación de Tuckey sobre los datos de sobrevida de los animales experimentalmente infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> tratados y no tratados con Simvastatina® | 57 |
| 4. Prueba estadística ANOVA de una vía con $P < 0,05$, sobre los datos de parasitemia promedio mediante el método de Herbert y Lumsden (1976) en los animales experimentalmente infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> tratados y no tratados con Simvastatina® | 57 |
| 5. Prueba estadística T de Student de Mann Whitney con $P < 0,05$, sobre los datos de parasitemia promedio mediante el conteo por cámara de Neubauer en los animales experimentalmente infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> tratados y no tratados con Simvastatina® | 57 |
| 6. Prueba estadística ANOVA de una vía con $P < 0,05$, sobre los datos de colesterol total en animales sanos y animales experimentalmente infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> tratados y no tratados con Simvastatina® | 58 |
| 7. Prueba estadística ANOVA de una vía con $P < 0,05$, sobre los datos de niveles de HDL en animales sanos y animales experimentalmente infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> tratados y no tratados con Simvastatina® | 58 |
| 8. Prueba estadística ANOVA de una vía con $P < 0,05$, sobre los datos de niveles de LDL en animales sanos y animales experimentalmente infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> tratados y no tratados con Simvastatina® | 58 |
| 9. Prueba estadística ANOVA de una vía con $P < 0,05$, sobre los datos de porcentaje de HDL en animales sanos y animales experimentalmente infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> tratados y no tratados con Simvastatina® | 58 |
| 10. Prueba estadística ANOVA de una vía con $P < 0,05$, sobre los datos de porcentaje de LDL en animales sanos y animales experimentalmente infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> tratados y no tratados con Simvastatina® | 59 |
| 11. Prueba estadística ANOVA de dos vías con $P < 0,05$ sobre los datos de concentración de colesterol en parásitos purificados de sangre de animales infectados experimentalmente con <i>Trypanosoma evansi</i> tratados y no tratados con Simvastatina® | 59 |

IV. LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|---------------|
| Colesterol Total | CT |
| Dietilaminoetil-celulosa | DEAE-celulosa |
| Dimetilsulfóxido | DMSO |
| Ácido etilendiaminotetraacético | EDTA |
| Ensayo de inmunoabsorbencia ligado a enzimas | ELISA |
| Hidroximetilglutaril-CoA | HMG-CoA |
| Inmunofluorescencia Indirecta | IFI |
| Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas | IVIC |
| Buffer fosfato salino | PBS |
| Buffer fosfato salino glucosado | PBSG |
| Lipoproteína de baja densidad | LDL |
| Receptor de lipoproteína de baja densidad | LDLR |
| Lipoproteína de alta densidad | HDL |

V. RESUMEN

Los tripanosomas, durante su ciclo de vida, experimentan distintos cambios ambientales, en respuesta a los cuales se adaptan cambiando su morfología, metabolismo energético y lipídico (Sealey, 2007). De hecho, se ha reportado que, a pesar de presentar una vía de síntesis endógena de lípidos, estos parásitos son capaces de incorporar colesterol y otros lípidos del medio por endocitosis mediada por receptores, planteando a su vez una inhibición de este mecanismo como estrategia terapéutica, cuyo desarrollo podría ser de gran utilidad puesto que se ha reportado que dicho receptor está altamente conservado a través del orden Kinetoplastida (Bastin y col. 1996).

Por otro lado, la Simvastatina[®] (inhibidor de hidroximetilglutaril-CoA reductasa) ha sido empleada con éxito en estudios realizados en estos parásitos: en *T. brucei* se comprobó que la forma procíclica puede sintetizar sus propios esteroides o adquirirlos del medio, y que estas dos vías se compensan entre sí; y en *Leishmania amazonensis* se determinó que la adquisición de colesterol exógeno es de suma importancia puesto que juega un rol como mecanismo compensatorio en respuesta a la presencia de inhibidores de la biosíntesis de esteroides (Coppens y Courtoy, 1995; Coppens y col., 1995^a; Andrade-Neto y col., 2011).

En *Trypanosoma evansi* no se conocen rutas de biosíntesis de lípidos, mucho menos como estas pueden estar reguladas. Debido a esto en el presente trabajo especial de grado se realizó un estudio en animales experimentales infectados con *T. evansi* tratados o no con Simvastatina[®], el cual ofrece datos preliminares que dan base a una nueva línea de investigación en el estudio del metabolismo del mismo, lo cual puede contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que tengan como blanco posible el receptor de LDL del parásito.

Para ello se trabajó con la cepa de *T. evansi* identificada como TeAp-ElFrio01 (Perrone y col., 2009), probando sobre ratas infectadas dosis de Simvastatina[®] recomendadas en la literatura para administrar en humanos, donde una dosis de 40mg/Kg/día de esta droga prolonga la sobrevivencia de los animales experimentalmente infectados con *T. evansi*, mientras que no tiene efecto alguno sobre la parasitemia encontrada en sangre, puesto que la misma se mantiene en niveles altos a pesar del tratamiento, lo cual puede deberse a una pérdida de viabilidad y/o virulencia del parásito como se ha observado en *T. brucei* y *T. cruzi* cuando son privados de esteroides tanto endógenos como exógenos (Coppens y Courtoy, 1995).

A su vez, no observó una alteración significativa de los niveles de colesterol total, HDL, LDL y sus proporciones en plasma de los animales infectados experimentalmente y tratados con Simvastatina[®] con respecto a las concentraciones encontradas en los controles en el tiempo durante el cual se realizó el presente estudio. Este hecho no concuerda con la bibliografía consultada puesto que existe un efecto comprobado de la Simvastatina[®] sobre estos valores, así como también se ha reportado una alteración en las concentraciones de lípidos en sangre de los animales debido a la infección con estos parásitos.

Por otro lado, mediante microscopía de fluorescencia se detectaron cambios en los patrones de distribución de colesterol no esterificado y lípidos polares de parásitos purificados de sangre de animales infectados experimentalmente con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina[®]. Mediante este método, se apreció una reducción en el tiempo a la mitad en la intensidad máxima asociada a colesterol no esterificado medida en parásitos del grupo tratado entre los días 8 y 22 post-infección, a diferencia del grupo control cuyo patrón de marcaje en ambos puntos fue similar. De la misma manera, la fluorescencia asociada a lípidos polares en los parásitos incrementó con el tiempo en ambos grupos, indicándose a su vez la acumulación de los mismos en algunas zonas de *T. evansi* a pesar del tratamiento con la droga.

Además, mediante un análisis por cromatografía de gases se comprobó que el colesterol está presente en *Trypanosoma evansi* en una proporción del 99% de los esteroides, siendo sus derivados los constituyentes del 1% restante. En la cuantificación del colesterol total presente en los parásitos se encontró en el grupo tratado que la concentración de este compuesto constituye el 50% del encontrado en el grupo control.

Los resultados obtenidos en este trabajo especial de grado sugieren que existe una acción de la Simvastatina[®] sobre *Trypanosoma evansi*, lo cual deriva en una disminución de la cantidad de colesterol en el parásito y en una alteración de la distribución de los lípidos, a pesar de la relativa normalidad de los niveles lipídicos en sangre.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Familia Trypanosomatidae:

Los tripanosomátidos son organismos que tienen un gran impacto en la salud y economía de la población mundial debido a su alta prevalencia en humanos y animales. Entre los miembros de esta familia los géneros más dañinos y por lo tanto más importantes en este ámbito, son *Leishmania* y *Trypanosoma*, causantes de la leishmaniasis y la tripanosomiasis respectivamente.

Como características predominantes los miembros de esta familia presentan un organelo denominado kinetoplasto, que corresponde a la región subapical muy modificada de una mitocondria, la única que poseen en su citoplasma; y una membrana ondulante, formación que aparece cuando un flagelo se une externamente a la membrana por una expansión de la misma que presenta un aspecto laminar (Figura 1) (Gállego, 2007).

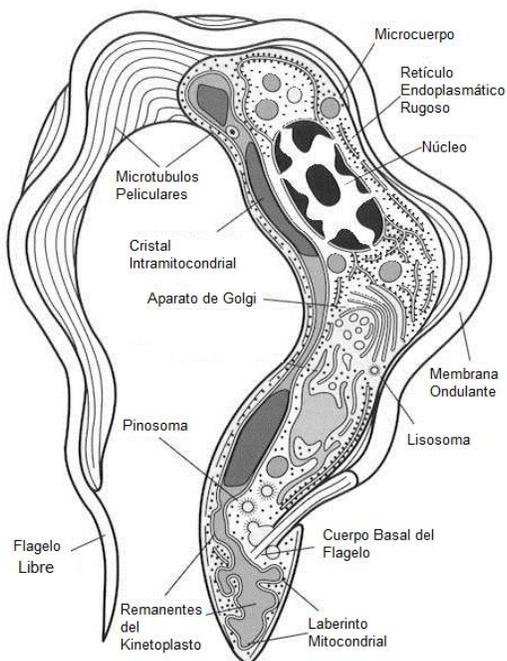


Figura 1: Se presenta un esquema detallado de *Trypanosoma evansi*. (Imagen modificada, original tomada de: <http://www.parasitemuseum.com/wp-content/gallery/trypanosome-life-cycle/trypanosoma-evansi.jpg>).

Los géneros de esta familia se diferencian por el tipo de hospedero que infectan y por su variación morfológica (en este grupo se presentan organismos pleomorfos y algunos monomórficos). Los ciclos de vida de estos parásitos son bastante complejos, y en la mayoría consisten en cambios morfológicos dramáticos entre estadios dentro de un insecto vector y un hospedero vertebrado (Hernández-Alcántara, 2003). Una de las pocas excepciones a este tipo de ciclo es el correspondiente a *Trypanosoma evansi*.

1.2. *Trypanosoma evansi* y la tripanosomosis animal:

Este, fue el primer tripanosoma patógeno diagnosticado en animales domésticos, en caballos y camellos de la India (1880), y en la actualidad se ha identificado en países del norte de África, del Medio Oriente, Asia, países europeos mediterráneos, en Centro y Sur América (Canelón y Meléndez, 2003; Forlano y col., 2011). En la India, también se ha registrado una cantidad importante de casos en humanos en una villa del país, lo cual ha sido asociado a la carencia de una biomolécula con actividad tripanolítica denominada apolipoproteína L-I (Shegokar y col., 2006; Vanhollebeke y col., 2006).

T. evansi y *T. vivax*, son considerados los agentes etiológicos de la tripanosomiasis animal en Venezuela, afectando a bovinos, equinos, caprinos y caninos (Toro, 1987; Espinoza y col., 1997; Camargo y col., 2004). García y colaboradores (2000), han reportado una seroprevalencia de 56-78% en tres hatos ganaderos del Estado Apure entre 1996 y 1998 mediante la técnica de IFI (inmunofluorescencia indirecta), con una mortalidad de moderada a alta (García y col., 2000). En un estudio más reciente Forlano y colaboradores (2011) reportan una seroprevalencia del 40% por la misma técnica (IFI), en equinos raza Criollo Venezolano en tres hatos diferentes del Estado Apure (Forlano y col., 2011). Esto se corresponde con el

gran impacto económico que tiene el parásito en este tipo de ganado, el cual es utilizado para el manejo de ganado vacuno de manera extensiva en los llanos venezolanos.

Trypanosoma evansi se encuentra en la sangre y linfa de los animales infectados, con una forma típica de tripomastigote. Comprende formas delgadas o intermedias parecidas a *T. brucei*, midiendo de 15 a 34 micras (24 en promedio). Este se reproduce por fisión binaria longitudinal (Quiroz, 1984).

En su ciclo evolutivo es transmitido mecánicamente mediante la saliva de moscas hematófagas (*Tabanus*, *Stomoxys*, *Haematopota*, *Lyperosia*, *Chrysops*), en las cuales no ocurre desarrollo alguno; o por el vampiro *Desmodus rotundus*, el cual puede actuar como hospedero intermediario (Quiroz, 1984). En este tipo de transmisión el agente contamina la superficie del vector, el tubo digestivo o, en este caso, el aparato bucal, de manera que el transporte se realiza de forma inespecífica y sin que el parásito se modifique dentro del insecto vector (Figura 2) (Universidad de la República de Montevideo). Esta es una diferencia importante entre este organismo y otros tripanosomas, los cuales tienden a tener un carácter pleomorfo, presentando por lo general cuatro estadios evolutivos: amastigote, promastigote, epimastigote y tripomastigote (Espinosa y col., 1998).

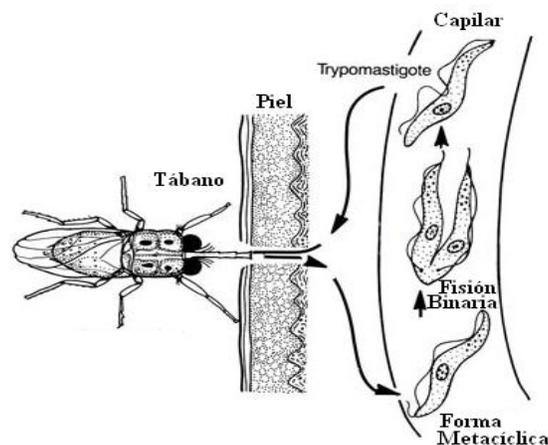


Figura 2: Ciclo de vida de *Trypanosoma evansi* (imagen modificada, original tomada de: <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/womack/fig01.jpg>).

A su vez, comprende una amplia gama de hospederos definitivos como lo son caballo, burro, bóvido, cabra, camello, ovino, cerdo, perro, búfalo de agua, elefante, capibara, tapir, venado y experimentalmente animales de laboratorio. En estos, la acción patógena depende de varios factores (susceptibilidad del hospedero y grado de patogenicidad de la cepa del parásito que varía de acuerdo con hospederos y localidades), pero en general presenta 3 efectos: una acción tóxica sobre el hospedero dada por productos de secreción y excreción, un efecto antigénico y una acción mecánica significativa a nivel capilar (Quiroz, 1984).

Los síntomas de la enfermedad que causa el parásito (llamada comúnmente derrengadera o mal de caderas en nuestro país) incluyen: fiebre intermitente, urticaria, edema en las patas y partes bajas del cuerpo, pérdida de pelo, decaimiento progresivo, pérdida de la condición general, inapetencia, conjuntivitis, abortos, ictericia, problemas nerviosos, incoordinación con parálisis de tren posterior. La mortalidad es del 50 al 100%, en perros en general es fatal, mientras que en bóvidos es enzoótica y sólo en ocasiones es detectable (Quiroz, 1984).

Por otra parte, es importante resaltar la estrecha relación que presenta *Trypanosoma evansi* con *T. brucei*. Según Hoare (1972), *T. evansi* evolucionó a partir de *T. brucei* al adaptarse a un modo de transmisión mecánico perdiendo su carácter pleomorfo, lo cual ha sido confirmado según Canelón y Melendez (2003) por varios estudios de biología molecular centrados en el análisis y comparación del ADN del kinetoplasto (kADN) de estos tripanosomas (Canelón y Melendez, 2003). Ambos son tripanosomátidos extracelulares, encontrándose en el torrente sanguíneo gracias a cambios periódicos de sus proteínas de superficie (VSG) (Hoare, 1972; Sealey, 2007). Una característica que distingue a *T. brucei* del

resto de los miembros de la familia Trypanosomatidae es que el esteroide mayoritario de su membrana es el colesterol (Sealey, 2007).

1.3. Colesterol:

Este compuesto es importante para todas las células eucariotas, puesto que modula la fluidez y permeabilidad de la membrana, regula la modificación covalente de algunas proteínas, así como la activación enzimática, además es precursor de las hormonas esteroideas y de los ácidos y sales biliares (Figura 3). En general, las células tienen diferentes vías para obtener el colesterol y regular su metabolismo, con una distribución regulada de su concentración en las membranas donde se encuentra en su forma no esterificada, y en el interior celular, donde es almacenado en forma de éster. Entre estos mecanismos están la síntesis endógena, la endocitosis mediada por receptores, y la transferencia mediada por receptores (Molina y col., 1991; Martínez y col., 2001; Shrivastava y Chattopadhyay, 2007).

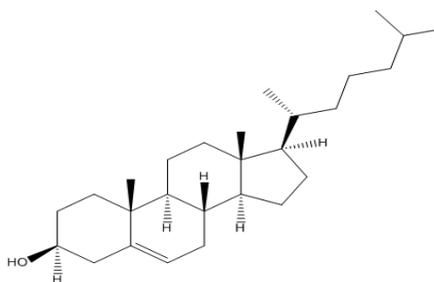


Figura 3: Estructura química del colesterol (imagen tomada de: <http://www.nature.com/nchembio/journal/v6/n1/images/nchembio.268-comp8.gif>).

La síntesis de colesterol en el hepatocito se produce a partir de acetil-CoA, mediante una cadena de reacciones de condensación, reducción e hidroxilación. En numerosas especies animales, incluida el hombre, la reacción que limita esta síntesis es la conversión de HMG-CoA a mevalonato, catalizada por la enzima HMG-CoA reductasa (Molina y col., 1991).

El colesterol es el esteroide más representativo en membranas de vertebrados, mientras que en eucariotas primitivos se presenta el ergosterol, su precursor. La estructura química del ergosterol difiere en la presencia de 2 dobles enlaces adicionales (C7 y C22) y un grupo metilo en el C24 de la cadena lateral. Ambos aspectos aparecen relativamente tarde durante la vía de síntesis del ergosterol (Figura 4), en respuesta a algunos requerimientos especializados relacionados con la fisiología de los organismos que lo contienen, tal como lo son algunos tripanosomátidos (Shrivastava y Chattopadhyay, 2007).

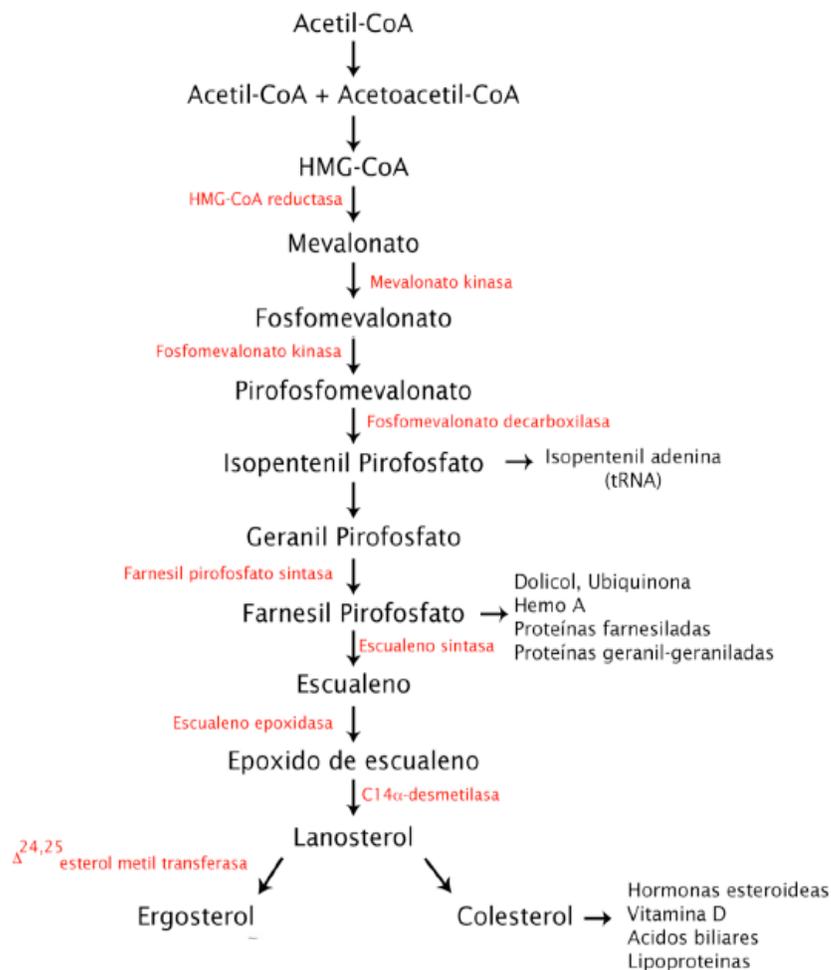


Figura 4: Vía de síntesis de colesterol y ergosterol, donde se muestran las enzimas involucradas en cada paso del proceso, observándose de primera a la HMG-CoA reductasa, enzima limitante de esta ruta (imagen tomada de: Sealey, 2007).

1.4. Lipoproteínas plasmáticas:

En la sangre, el colesterol total existe en forma libre o unido a lipoproteínas que lo solubilizan en el agua intravascular, facilitando así su transporte en plasma o linfa.

Las lipoproteínas son macromoléculas que incluyen un núcleo de lípidos hidrófobos (triglicéridos, ésteres de colesterol) y una zona superficial hidrofílica (fosfolípidos, colesterol no esterificado y apolipoproteínas) (Figura 5). Las apolipoproteínas, son proteínas especializadas necesarias para la formación de estos complejos y para la unión de los mismos con los receptores celulares (Coppo y col., 2003).

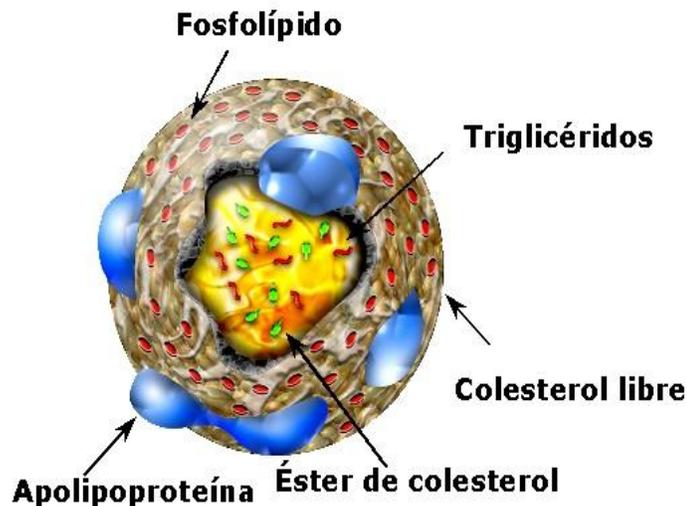


Figura 5: esquema general de la estructura de las lipoproteínas (imagen tomada de: <http://www.ehu.es/biomoleculas/lipidos/jpg/lipoproteina.jpg>)

La clasificación de estas macromoléculas se realiza en base a la densidad de ultracentrifugación: HDL (lipoproteínas de alta densidad, α), LDL (baja densidad, β), VLDL (muy baja densidad, pre- β) e IDL (densidad intermedia, β -flotadora), siendo las dos últimas muy escasas en animales adultos. Las HDL se forman en intestino e hígado, son las más pequeñas y densas y su rol es el transporte reverso de colesterol, desde los tejidos hacia el emuntorio biliar, por lo que son consideradas como “factor de protección” del riesgo

aterogénico. Las LDL son los productos finales de las VLDL (sintetizadas por enterocitos y hepatocitos) y están involucradas en el denominado transporte directo del colesterol, que lo distribuye y deposita en los tejidos. Su vida termina cuando son internalizadas (endocitosis mediada por receptores) y clivadas por enzimas lisosomales (Coppo y col., 2003). Esta vía está autorregulada, de forma que cuando la célula tiene cubiertas sus necesidades de colesterol se suprime la síntesis de LDLR (Molina y col., 1991).

1.5. Estatinas: Simvastatina®

En el mercado se presentan variados fármacos que ayudan a controlar los niveles de colesterol y por lo tanto el nivel de lipoproteínas en la sangre, entre estos tenemos las estatinas. Estas son drogas diseñadas para disminuir el nivel de colesterol en sangre reduciendo la producción del mismo por el hígado al bloquear la HMG-CoA reductasa, restringiendo así el paso limitante de la síntesis de colesterol (Figura 4), resultando en la regulación de los receptores de LDL en la membrana celular y en la reducción de las consecuencias del LDL aterogénico, siendo capaces de disminuir la formación de nuevas placas contenedoras de colesterol dentro de las arterias (aterosclerosis) y reduciendo ocasionalmente el tamaño de las placas existentes (Jasinska y col., 2007).

La Simvastatina® es un tipo de estatina que ayuda al control de los niveles de colesterol mediante dos mecanismos: reduciendo los niveles de LDL a la vez que incrementa los de HDL. Esta se hidroliza en el hígado a la forma activa de β -hidroxiácido, potente inhibidor de HMG-CoA reductasa (Figura 6) (Parker, 2011).

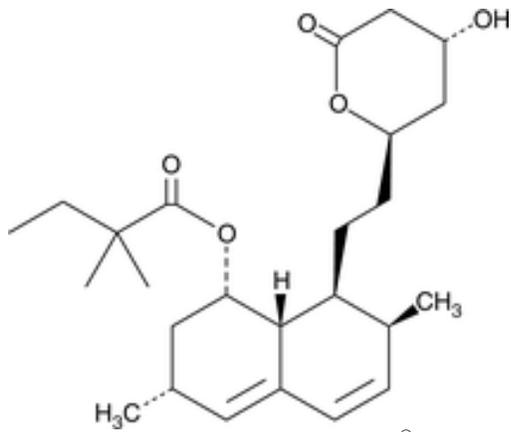


Figura 6: Estructura química de la Simvastatina® (imagen tomada de: <http://www.caymanchem.com/pdfs/10010344.pdf>).

2. ANTECEDENTES

2.1. Estudios a nivel internacional:

Los tripanosomas, durante su ciclo de vida, experimentan distintos cambios ambientales, en respuesta a los cuales se adaptan cambiando su morfología, metabolismo energético y lipídico (Sealey, 2007).

A diferencia de *Leishmania sp.* y *T. cruzi* (los cuales muestran una proporción de colesterol del 10-50% de esteroides, a pesar de tener la capacidad de síntesis *de novo* de los mismos), los tripanosomas africanos poseen una capacidad limitada de síntesis de esteroides *de novo*. Las formas sanguíneas de *T. brucei* se diferencian del resto de los tripanosomas ya que el esteroide mayoritario que poseen en sus membranas es el colesterol, el cual es incorporado del medio a través de una endocitosis mediada por el receptor de LDL (Sealey, 2007).

Para *T. brucei* existen numerosos trabajos en los cuales se estudia bioquímicamente su receptor de LDL. En 1987 Coppens y colaboradores realizaron un estudio donde comprobaron que el LDL y otras proteínas del plasma del hospedador eran tomados mediante un proceso mediado por receptor en la forma sanguínea de este parásito (Coppens y col., 1987). Luego, en 1988 este grupo de trabajo logra purificar este receptor y reportaron que esta macromolécula (LDL) es requerida para el crecimiento óptimo del parásito (Coppens y col., 1988). En 1992, reportan que el receptor de LDL se encuentra en todas las variantes de *T.b. brucei*, que es un antígeno de superficie estable y que presenta similitudes tanto bioquímicas como inmunológicas con el receptor de LDL en ratas (Coppens y col., 1992).

Posterior a estas publicaciones, Coppens y colaboradores (1995) pasan a enfocarse en la importancia de la presencia de este receptor en este parásito, reportando que efectivamente las lipoproteínas de baja densidad del hospedero son una fuente esencial de lípidos y colesterol para las formas sanguíneas del mismo (Coppens y col., 1995b). Coppens y Courtoy realizan en el año 2000 una revisión completa acerca del receptor de LDL y su relación con la homeostasis de esteroides en las diferentes formas del parásito, en la cual señalan la regulación de la expresión de este receptor por la concentración de LDL en el medio, y como esto regula a su vez la síntesis *de novo* de esteroides por parte del parásito (Coppens y Courtoy, 2000).

En 1996, Bastin y colaboradores reportaron una proteína de unión a LDL de 145.000 Da, conservada a través de todo el orden Kinetoplastida. Estos autores trabajaron con distintos organismos de este orden (*T. equiperdum*, *T. congolense*, *T. vivax*, *Leishmania donovani*, *Crithidia luciliae* y *Phytomonas sp.*), utilizando a *T.b. brucei* como organismo control, comprobando que todos ellos acumulan ¹²⁵I-LDL humano (aquellos que se encuentran en el torrente sanguíneo presentaron una tasa más alta de acumulación) y que presentan una proteína similar al receptor de LDL de *T.b. brucei*. Además, de cada especie lograron aislar una proteína de masa molecular similar mediante cromatografía de afinidad de LDL, y la misma pudo ser detectada en inmunoblots y ELISA's realizados con anticuerpos policlonales y monoclonales contra el receptor de LDL de *T.b. brucei* (Bastin y col. 1996).

Se ha reportado que los inhibidores de la síntesis de colesterol en humanos, tales como la Simvastatina[®], afectan el contenido de esteroides de *T. brucei* y *Leishmania amazonensis*. Coppens y colaboradores (1995) han detectado en *T. brucei* actividad HMG-CoA reductasa y

como es afectada por la droga, cultivando tanto las formas procíclicas como los tripomastigotes en un medio enriquecido con la Simvastatina[®] (Coppens y col., 1995a). Este ensayo, sumado a otro estudio realizado por Coppens y Courtoy (1995) en el cual comprueban que la forma procíclica puede adquirir colesterol tanto de una fuente exógena como de una endógena (síntesis *de novo*), les permitió concluir que estas dos vías (aquella que involucra una actividad HMG-CoA reductasa y la que involucra al receptor de LDL) se compensan entre sí, ilustrando la adaptación de los parásitos para sobrevivir en ambientes extremadamente diferentes (Coppens y Courtoy, 1995).

En *Leishmania amazonensis*, Andrade-Neto y colaboradores (2011) muestran que el sistema de adquisición de colesterol exógeno juega un rol como mecanismo compensatorio en respuesta a la presencia de inhibidores de la biosíntesis de esteroides, dado que consiguieron que la acumulación de colesterol exógeno es debido a un incremento en la incorporación de LDL, y que el IC₅₀ de las drogas probadas se reduce un 50% en ausencia de colesterol, aumentando así su efectividad (Andrade-Neto y col., 2011).

Por otro lado, Pereira y colaboradores (2011) han establecido una correlación directa entre la concentración de suero en el medio de cultivo y la presencia de inclusiones lipídicas cristaloides denominadas reservosomas en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Los reservosomas son organelos involucrados en la vía endocítica del parásito, en donde se acumulan un set de proteínas y enzimas relacionadas con la digestión proteica y el metabolismo lipídico. En este trabajo estos investigadores concluyen que las formas epimastigotes de *T. cruzi* acumulan grandes cantidades de lípidos neutros de un medio

extracelular, mayoritariamente colesterol o sus ésteres, dentro de los reservosomas y que además estos son capaces de desensamblar las inclusiones cristaloides de colesterol cuando se les priva de suero (Pereira y col., 2011).

Es importante resaltar que no se han realizado estudios acerca del metabolismo lipídico de *Trypanosoma evansi*.

2.2. Estudios a nivel nacional:

En el laboratorio en el cual se llevó a cabo el trabajo de grado (Laboratorio de Fisiología de Parásitos del Centro de Bioquímica y Biofísica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas), se realizó un estudio preliminar mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas en el cual se determinó la relación de esteroides en *T. evansi*, encontrándose que en un 99% se presenta, curiosamente, el colesterol.

3. JUSTIFICACIÓN

T. evansi, agente etiológico de la tripanosomosis equina, es uno de los tripanosomátidos con mayor distribución a nivel mundial. En el país se ha registrado una alta prevalencia del mismo, lo cual sumado a la resistencia a drogas que presenta, hacen necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas en su contra. Sin embargo, son pocos los trabajos que se han desarrollado con respecto a la caracterización del metabolismo lipídico del parásito, de donde podrían obtenerse nuevos blancos terapéuticos.

Se ha reportado que los tripanosomátidos son capaces de incorporar colesterol y otros lípidos del medio, planteando a su vez una inhibición de este mecanismo como estrategia terapéutica. Por otro lado, la Simvastatina[®] ha sido empleada con éxito en estudios realizados en estos parásitos: con *T. brucei* se comprobó que la forma procíclica puede sintetizar sus propios esteroides o adquirirlos del medio, y que estas dos vías se compensan entre sí; y con *Leishmania amazonensis* se determinó que la adquisición de colesterol exógeno es de suma importancia puesto que juega un rol como mecanismo compensatorio en respuesta a la presencia de inhibidores de la biosíntesis de esteroides (Coppens y Courtoy, 1995; Coppens y col., 1995^a; Andrade-Neto y col., 2011).

Por las razones antes expuestas, en el presente trabajo especial de grado se realizó un estudio en animales experimentales infectados con *T. evansi* tratados con Simvastatina[®], el cual ofrece datos preliminares que dan base a una nueva línea de investigación en el estudio del metabolismo del mismo, lo cual puede contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que tengan como blanco posible el receptor de LDL del parásito.

4. OBJETIVOS

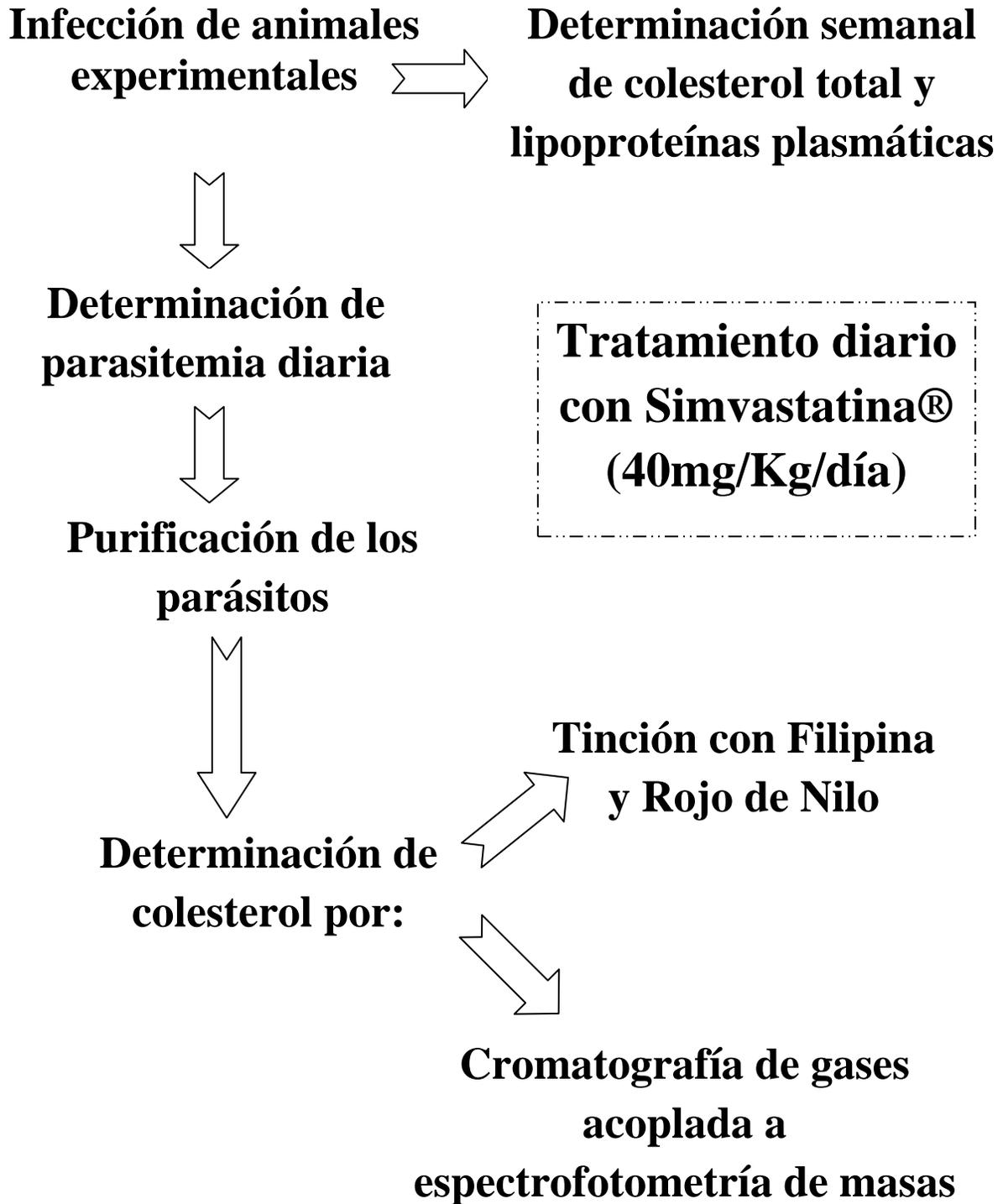
4.1. Objetivo General:

Determinar el efecto de un inhibidor comercial de la hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa (Simvastatina[®]), en la concentración de lípidos neutros de *Trypanosoma evansi* en animales infectados experimentalmente.

4.2. Objetivos específicos:

- Probar sobre ratas infectadas dosis de Simvastatina[®] recomendadas en la literatura para administrar en humanos.
- Determinar el efecto de la Simvastatina[®] sobre la sobrevivencia y parasitemia de los animales experimentalmente infectados.
- Determinar alteraciones en los niveles de colesterol, HDL y LDL en el plasma de los animales experimentalmente infectados y tratados o no con Simvastatina[®].
- Determinar cualitativamente alteraciones en la concentración de colesterol no esterificado en parásitos provenientes de animales infectados experimentalmente tratados y no tratados con Simvastatina[®].
- Determinar cuantitativamente alteraciones en la concentración de colesterol en parásitos provenientes de animales infectados experimentalmente tratados y no tratados con Simvastatina[®].

5. PLAN DE TRABAJO



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepa:

Se trabajó con la cepa de *T. evansi* identificada como Ec/Rn/Frío/1991, derivada de un aislado obtenido en el año 1991 en el hato “El Frío” ubicado en el Edo. Apure, a partir de un caballo con síntomas de derrengadera (Boada-Sucre y col., 2004). En el laboratorio donde se desarrolló este Trabajo Especial de Grado se ha cambiado esta nomenclatura a TeAp-ElFrio01 (Perrone y col., 2009). La cepa se criopreservó en sangre de ratas machos de 250 g de peso (IVIC Sprague-Dawley) infectados con el parásito, la cual es almacenada en nitrógeno líquido (-196C°) con dimetilsulfóxido (DMSO) 15%, como agente crioprotector.

6.2. Animales Experimentales:

Se trabajó con ratas machos albinas de 250g de la cepa IVIC Spague-Dawley como modelo experimental para cultivos *in vivo*. Las mismas fueron inoculadas intraperitonealmente con 0,1mL de sangre infectada con la cepa TeAp-ElFrio01 de *T. evansi* almacenada en el laboratorio. Previo a la infección se verificó la motilidad de los tripanosomas recién descongelados.

6.3. Tratamiento:

Se administró una dosis de 40mg/Kg/día de Simvastatina[®] de Leti-Genven, S.A., por vía oral desde el día de la infección experimental. Esta se estableció a partir de una revisión bibliográfica de las dosis de Simvastatina[®] comúnmente administradas en humanos, donde el rango va de 5mg a 80mg al día, siendo las dosis de 20 y 40mg las más usuales. La dosis más alta (80mg al día) solo se considera cuando se espera que los beneficios superen los riesgos

potenciales, y en ciertos casos este tratamiento se debe administrar dividido en 3 dosis: dos de 20mg y una de 40mg (Ruiz y col., 2008; Drug Safety Update, 2010; Instituto de Salud Pública de Chile, 2010; Merck Sharp & Dohme Ltd, 2012).

Posterior a esto se probaron las dosis más comunes (20mg y 40mg), realizándose un experimento controlado con 3 grupos de animales infectados experimentalmente: un control al cual no se le administró droga, un segundo grupo con una dosis de 20mg/Kg/día y un tercer grupo con una dosis de 40mg/Kg/día, definiéndose esta última como la dosis más adecuada para el experimento a realizar.

La droga se encuentra disponible en una presentación de comprimidos de 80mg, los cuales se pulverizaron y se administraron en una suspensión con agua destilada en un volumen no mayor a 0,2mL. Dicha suspensión se preparó diariamente y el remanente se descartó pasados 2 días a fin de evitar desestabilización del compuesto activo (referencia obtenida por comunicación oral de la Dra. Javielis Manzilla; Cayman Chemical).

6.4. Grupos Control:

En este trabajo se utilizaron 3 controles como sigue:

Control Sanos: consistente de ratas machos albinas de la cepa IVIC Spagüe-Dawley de 250g sanos sin infectar a los cuales se les realizaron todos los estudios pertinentes.

Control Droga: consistente de ratas machos albinas de la cepa IVIC Spagüe-Dawley de 250g sanos sin infectar a los cuales se les administró la dosis correspondiente de droga y se les realizaron todos los estudios pertinentes.

Control Infectados: consistente de ratas machos albinas de la cepa IVIC Spagüe-Dawley de 250g infectados con la cepa TeAp-ElFrio01 de *T. evansi*, a los cuales se les realizaron todos los estudios pertinentes.

6.5. Monitoreo de la Parasitemia:

El monitoreo de la parasitemia se realizó diariamente mediante el conteo de los parásitos por el método de Herbert y Lumsden (1976) o por cámara de Neubauer.

Herbert y Lumsden (1976):

En este método se observan 1-20 campos microscópicos de una capa húmeda de sangre infectada en objetivo de 40X y se encuentra la correspondencia con una serie de 8 imágenes de campos microscópicos que representan concentraciones de tripanosomas decrecientes en bloques reducidos a la mitad de 256 a 2 organismos por campo (Figura 7).

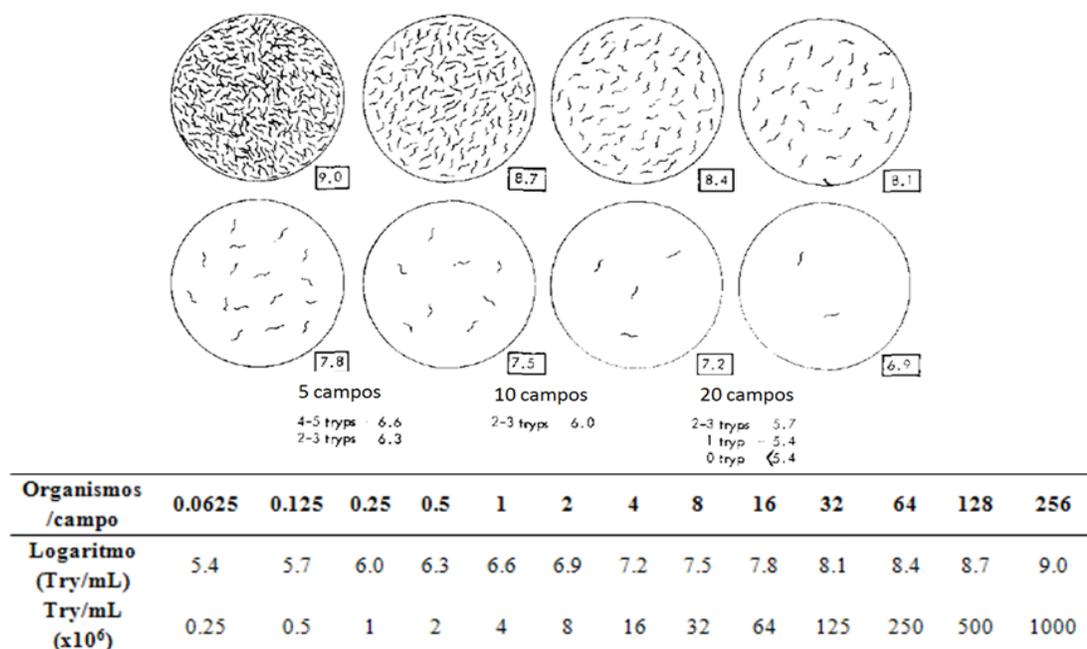


Figura 7: Gráfico para estimar parasitemias de tripanosomas mediante el método de Herbert y Lumsden (1976) (imagen tomada de: Herbert y Lumsden, 1976)

Este principio de los bloques reducidos a la mitad se puede extender por debajo de los 2 organismos por campo examinando más de un campo, de manera de establecer una concentración en número de tripanosomas por campo (que debe estar por encima de 0.0625 organismos por campo), la cual se compara con una tabla establecida por los mismos autores en la cual se relaciona el número obtenido con el logaritmo equivalente de número de tripanosomas por mL de sangre (Tabla 1).

Cámara de Neubauer: para el conteo mediante este método se cortó la punta de la cola de cada rata y se tomó una gota de sangre a la cual se le realizó una dilución en PBSG que permitió el conteo efectivo de los parásitos. El PBSG es una solución amortiguadora cuyo pH se mantiene en 8 y que presenta glucosa como componente energético para los parásitos durante el proceso.

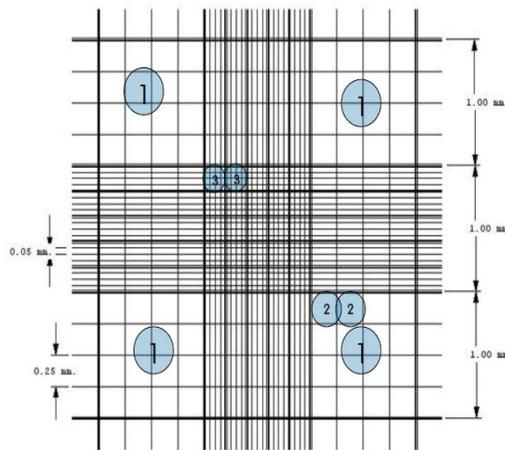


Figura 8: Detalle de la rejilla de una Cámara de Neubauer (imagen tomada de: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>)

Para la determinación de la parasitemia (número de parásitos/mL de sangre) se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Parasitemia} = \frac{\text{número de células}}{\text{número de cuadros} \times \text{dilución} \times \text{factor de la cámara}}$$

donde el factor de la cámara corresponde a 1×10^{-4} mL, y se calculó multiplicando el área de la superficie contenedora ($0,01 \text{ cm}^2$, correspondientes a los cuadros grandes de las esquinas marcados como 1 en la Figura 8), multiplicada por la profundidad de la cámara (0,01cm, la cual es específica para la cámara utilizada) (Bastidas, instructivo de Celeromics).

6.6. Purificación de *Trypanosoma evansi*:

Se realizó una cromatografía de intercambio aniónico empleando una columna de DEAE-celulosa, técnica descrita por Lanham y Godfrey en 1970 para separar los tripanosomas de los componentes sanguíneos.

Metodología:

La purificación de los parásitos se realizó una vez por semana, iniciando el día en cual se alcanzó una parasitemia óptima (en el orden de 10^7 - 10^9).

- Preparación de la Columna

En una jeringa de 10mL, previamente dispuesta sobre pinzas y sostenida por un soporte universal, se empaquetaron 10mL de DEAE-celulosa en PBS (95mM Na_2HPO_4 ; 5mM NaH_2PO_4 ; 73mM NaCl; pH 8,0).

Posterior a esto se equilibraron las cargas de la resina a pH 8,0 realizando un lavado de aproximadamente 8 volúmenes de PBS, pH 8,0. Luego se realizó un segundo lavado con cinco

volúmenes de PBSG (proporción 6:4 PBS:H₂O con glucosa al 1%, tal como recomiendan los autores para trabajar con *T. evansi* en ratas) a temperatura ambiente. Se monitoreo el pH del eluato hasta llegar a pH 8,0, punto en el cual se consideró equilibrada la columna.

- Extracción de sangre infectada:

Se anestesió al animal empleando tiopental sódico (0,05g/mL), a razón de 0,1mL por cada 100gr del animal, de forma subcutánea. Se realizó una punción cardíaca utilizando una jeringa de 10mL con 1ml de EDTA 15% (pH 8,0), recolectando 9-13mL de sangre del animal.

Se colectó la sangre extraída en tubos plásticos cónicos y se centrifugó a 750×g/10min. Se descartó el plasma, se realizó un lavado con PBSG y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y con una pipeta Pasteur se colectó la capa leucocitaria (capa en la cual se encuentran los parásitos), y se resuspendió en PBSG (relación 1:3, sangre:PBSG). Esta suspensión celular se lavó una ó dos veces más en las condiciones de centrifugación descritas previamente.

- Purificación de los tripanosomas:

Se tomó la muestra de capa leucocitaria y se agregó a la columna, estableciendo un flujo lento (12gotas/min). El monitoreo de la salida de los parásitos se realizó mediante observación directa del eluato al microscopio de luz. Dicho eluato se recolectó en tubos Falcon[®], se concentró centrifugando a 750×g/10min y el sedimento se resuspendió en 2-3ml de PBSG. Esta suspensión se trasvasó a tubos Eppendorf[®] de 1,5mL y se centrifugó en microcentrifuga a 6000×g/1min, descartando luego el sobrenadante y almacenando a -80°C.

6.7. Fijación de parásitos:

Una vez purificados, los parásitos se fijaron y se dispusieron en portaobjetos a fin de realizar la tinción con Filipina (Sigma-Aldrich®) y Rojo de Nilo (Sigma-Aldrich®). Para esto se tomó una alícuota del eluato anterior a una concentración final de 10^6 - 10^7 parásitos/mL en un Eppendorf® y se agregó formaldehído (4%, tamponizado con fosfato, pH 7,3) a 4°C en una relación 5:1 con respecto al eluato, dejando actuar por 10min.

Por otro lado se prepararon portaobjetos con gelatina de cromo. Esta se dispuso de forma homogénea en cada lámina y se agregaron los parásitos fijados. Después de secar se realizaron 3 lavados con PBS y se guardaron a -20°C.

6.8. Tinción con Filipina y Rojo de Nilo.

La determinación cualitativa del colesterol en parásitos purificados se realizó mediante una tinción con el antibiótico macrólido Filipina, el cual se une al colesterol no esterificado por su grupo 3'-OH y es intrínsecamente fluorescente. A su vez, se empleó el Rojo de Nilo, una molécula heterocíclica sin carga muy soluble en disolventes orgánicos y lípidos, pero relativamente insoluble en agua; su fluorescencia máxima depende de la hidrofobicidad relativa del entorno, propiedad única que permite teñir tanto lípidos neutros (color amarillo oro) como fosfolípidos (color naranja rojizo) (Fowler y Greenspan, 1985; Pecht y col., 2007; Uronen, 2011).

Para esto, los parásitos fijados se permeabilizaron empleando digitonina (50µg/mL) en PBS por 5min, se lavó con PBS y se procedió a incubar con cloruro de amonio (50mM) en

PBS por 30min. Posteriormente, se realizó la tinción incubando con Filipina (100 μ g/mL) y Rojo de Nilo (0,5 μ g/mL) en PBS por 1hora en cámara húmeda y a oscuridad.

Se colocó una gota de PBS y cubreobjetos y se procesaron las imágenes mediante un microscopio de fluorescencia Nikon E600 (Tokio, Japón), acoplado a una cámara digital Canon Rebel T3i, empleando un filtro B2A.

Control sin lípidos: Se sustituyó el paso de permeabilización con una incubación por 30min en HCL (1%) en cloroformo:metanol (3:1) y se procedió como se indicó anteriormente.

Este protocolo se realizó a partir de información pertinente reportada por Makino y colaboradores (2006) y Pecht y colaboradores (2007).

6.9. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrofotometría de masas:

La determinación cuantitativa del colesterol se realizó a partir de las muestras de parásitos purificados almacenadas en nitrógeno líquido. Para esto realizó una modificación de la metodología propuesta por una modificación de la metodología propuesta por Tserng y Griffin (2003).

A cada muestra se le añadió 200 μ L de buffer fosfato (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, NaHPO 10mM, KHHPO 2mM; pH 6,2), se agitó y a esta mezcla se le agregaron 3mL de cloroformo:metanol (3:1), se agitó nuevamente y se llevó a centrifugar a 1370 \times g por 4 minutos. Se tomó la capa orgánica y se llevó a desecar en rotavapor, recogiendo el residuo con 1mL de cloroformo:metanol (3:1). Esta fracción se pasó por una columna de silica gel de 2cm previamente calibrada con la misma mezcla, eluyendo luego con 2mL del solvente.

El eluato se procesó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en el equipo Agilent GC/MSD 6890/5973, empleando una columna capilar HP 19091B-102 Ultra 2 (5% fenil metil siloxano, 25m x 200 μ m x 0,33 μ m nominal). Las condiciones de la corrida fueron las siguientes: Flujo: Helio, 0,7 mL/min con una velocidad de 36 cm/seg; volumen de inyección: 1 μ L; temperatura del inyector: 270°C (Splitless); presión del inyector: 22,1; temperatura del horno: 200°C inicial, con rampa a 7°C/min hasta 300°C, se mantiene por 5min; temperatura del detector: 300°C; tiempo de corrida: 19,29min; modo Split relación 70:1.

6.10. Obtención de plasma sanguíneo de los animales experimentales:

Para esto se realizó la extracción de 400-500 μ L de sangre de la cola de cada animal en Eppendorf[®] con 10 μ L de EDTA 15%. Posteriormente se centrifugó a 3000 \times g por 5min en una microcentrifuga, se trasvasó el plasma a otro Eppendorf[®] y se guardó a 4°C hasta su utilización. Este procedimiento se realizó de forma semanal.

6.11. Determinación de colesterol total (CT) en plasma:

Para la cuantificación del CT se siguió la metodología planteada por Bowman y Wolf (1962). Se requirió de la preparación de la muestra problema, de un blanco y de un estándar de la siguiente manera:

Muestra: se tomó una alícuota de 50 μ L de plasma en un tubo cónico, se le agregó 2,5mL de etanol absoluto, se agitó y se centrifugó a 583 \times g por 10min. Posterior a esto, se transfirió 1mL del sobrenadante a tubos de vidrio (por duplicado) a fin de realizar la reacción de color, para la cual se agregó el reactivo Zak (dilución 2/27 en H₂SO₄ concentrado de una solución consistente en 2,5gr FeCl₃.6H₂O diluidos en 100mL de H₃PO₄ al 87%). Se agitó y,

una vez frío, se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550nm (el color es estable hasta por lo menos 2h).

Blanco: se tomó una alícuota de 50µL de H₂O y se le agregó 1mL de etanol absoluto. Se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

Estándar: se preparó una solución stock de 100mg de colesterol en 100mL de etanol absoluto y se determinó la concentración verdadera mediante peso seco. De esta solución se tomó 1mL y se diluyó en 10mL de etanol.

Para calcular el factor, se tomaron alícuotas de 100, 250 y 500µL del estándar, se les agregó 50µL de H₂O y se completó hasta 1mL con etanol. Luego se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

$$\text{Cálculo: } \frac{\text{D.O.muestra}}{\text{D.O.S.T.}} \times []_{\text{S.T.}} \times \frac{2,5\text{mL}}{0,050\text{mL}} \times \frac{1\text{mg}}{1000\mu\text{g}} \times \frac{100\text{mL}}{1\text{mL}} = \text{mg}/100\text{mL}$$

6.12. Determinación de Lipoproteínas (HDL y LDL) del plasma:

Para la cuantificación de las lipoproteínas sanguíneas se realizó una corrida electroforética en agarosa, tal como lo indican Camejo y colaboradores (1981).

Preparación del gel: Se disolvió una solución de agarosa tipo I (0,6% en buffer Tris-HCL 0,1M, pH 8,2), colocándola posteriormente en un baño a 56°C. A esta solución se le agregó albumina al 0,2% disuelta en 1mL del buffer.

En una lámina portaobjetos se agregaron 4mL de la preparación anterior, realizando un bolsillo en la parte inferior a 2cm del borde para colocar la muestra.

Muestra: se preparó en un tubo de ensayo agregando 100µL de plasma, 100µL de agarosa y 50µL de Sudan Black 2% en etilenglicol. Se colocaron 50µL de esta preparación en el bolsillo del gel.

Corrida: 5mA por lámina portaobjetos a corriente constante. El buffer de corrida consistió en Barbital-HCL 50mM, pH 8,8.

Una vez separadas las bandas, se cortó cada una y se colocaron por separado en tubos de vidrio Pyrex con tapa de teflón con rosca, se añadieron 2mL de H₂O y se llevaron a baño de María hasta disolver la agarosa. Para el blanco y el estándar se cortó un pedazo de agarosa libre de muestra y se realizó el mismo procedimiento.

Posterior a esto, se agregaron 2mL de butanol y se agitó en vórtex por un minuto. En el caso del estándar se agregó la alícuota del mismo, se completó a 2mL con butanol y se agitó en vórtex por 1min.

Estos tubos se llevaron a centrifugar a 2332xg por 1h, después de lo cual se tomó 1mL del sobrenadante y se le añadió 1mL del reactivo de Zak. Se agitó y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550nm.

Cálculos:

$$Factor = \frac{D.O.estandar - D.O.blanco}{[]estandar \times alicuota\ del\ estandar} \quad Colesterol \left(\frac{mg}{100mL} \right) = \frac{D.O.muestra - D.O.blanco \times 5}{Factor}$$

6.13. Procesamiento estadístico:

Los datos obtenidos fueron clasificados como no paramétricos puesto que no presentaron una distribución normal de acuerdo a las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Posterior a esto, de manera de establecer si existía diferencia significativa entre los grupos o no, se aplicaron pruebas de ANOVA de una vía con la prueba *a posteriori* Tuckey, ANOVA de dos vías o T de Student dependiendo de los datos a analizar.

7. RESULTADOS

Efecto de Simvastatina[®] en sobrevida y parasitemia de animales experimentalmente infectados con *Trypanosoma evansi*.

Las dosis de Simvastatina[®] comúnmente administradas en humanos son de 20mg y 40mg una vez al día. Dichas dosis se emplearon en una prueba donde se determinó si la administración de esta droga tenía algún efecto sobre la parasitemia y sobrevida de animales experimentalmente infectados con *Trypanosoma evansi*. En la Figura 9 se puede apreciar que en aquellos animales tratados con la dosis de 40mg la sobrevida se prolongó significativamente con respecto a los controles y a los tratados con 20mg de la droga.

A estos datos se les aplicó un análisis de varianza (valor $P < 0,05$; ver Tabla 2, apéndice 1) acompañado de la prueba *a posteriori* de Tuckey (ver Tabla 3, apéndice 1), el cual indica que efectivamente existe una diferencia significativa entre el grupo tratado con 40mg de Simvastatina[®] y el resto de los grupos. Es importante destacar que, a pesar de que en la gráfica se aprecia una mayor sobrevida para el grupo control, entre este y el grupo tratado con una dosis de 20mg no se encontró diferencia significativa.

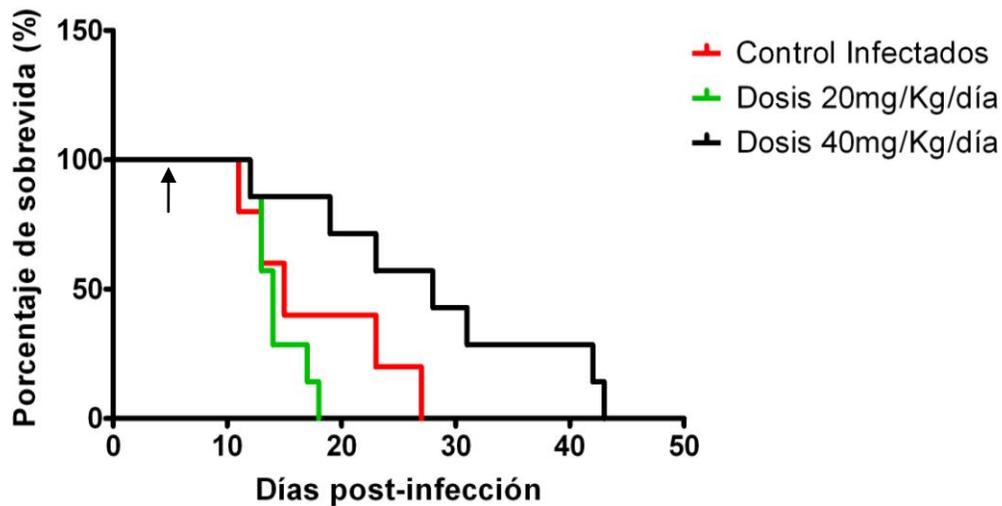


Figura 9: Supervivencia. En esta figura se aprecia la supervivencia de los animales experimentales de cada grupo (control infectados en rojo, dosis de 20mg/Kg/día en verde y dosis de 40mg/Kg/día en negro), una vez realizada la infección experimental e iniciado el tratamiento con Simvastatina[®]. La flecha indica el momento en el que se hizo visible la parasitemia. Se trabajó con una muestra de 7 animales por grupo (n=7).

En la Figura 10 se presenta la parasitemia diaria para cada grupo experimental según el método de Herbert y Lumsden (1976), la cual tiende a aumentar a medida que van pasando los días. En esta gráfica no se observó una diferencia significativa entre los grupos (valor P= 0,0519; ver Tabla 4, apéndice 1).

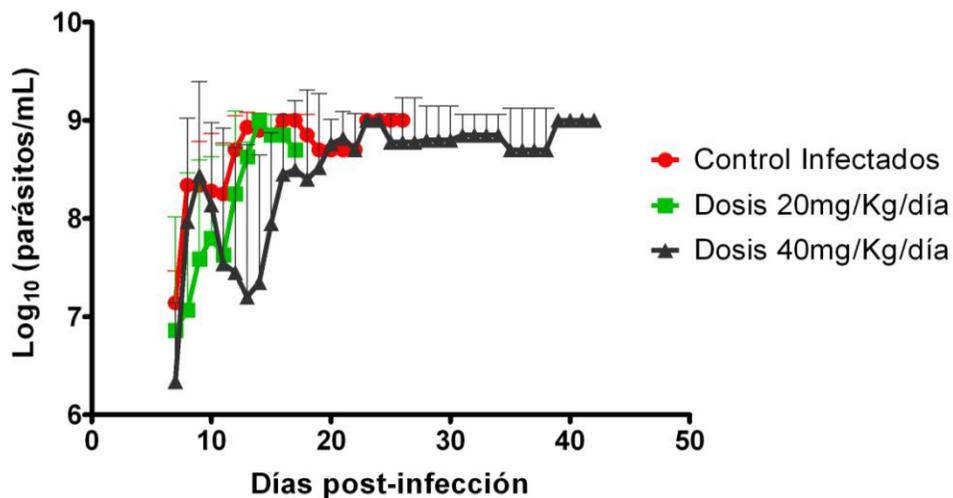


Figura 10: Parasitemia promedio mediante el método de Herbert y Lumsden (1976). En esta figura se aprecia la parasitemia de los animales experimentales de cada grupo con su respectiva desviación estándar (control infectados en rojo, dosis de 20mg/Kg/día en verde y dosis de 40mg/Kg/día en negro), determinada diariamente una vez realizada la infección e iniciado el tratamiento con Simvastatina[®]. Se trabajó con una muestra de 7 animales por grupo (n=7).

Con los resultados obtenidos se estableció la dosis de 40mg/Kg/día de Simvastatina[®] a emplear en experimentos posteriores, puesto que con la misma se obtuvo una mayor sobrevivencia de los animales infectados, permitiendo así el estudio del curso de la enfermedad por un mayor tiempo post-infección.

Para una determinación más precisa de la parasitemia en el curso de la infección se realizó el conteo diario de los parásitos en sangre empleando una cámara de Neubauer. Con este método tampoco se encontró diferencia significativa entre el grupo control y el grupo tratado con la dosis seleccionada (valor P= 0,2250; ver Tabla 5, apéndice 1; ver Figura 20, apéndice 2).

Niveles de colesterol, HDL y LDL en el plasma de los animales experimentalmente infectados con *Trypanosoma evansi* y tratados con Simvastatina[®].

Se evaluaron los niveles de colesterol total y de lipoproteínas de alta y baja densidad en plasma de los animales infectados durante 3 semanas post-infección.

En la Figura 11 se puede observar que la concentración de colesterol total, HDL y LDL en el plasma de los animales infectados tratados o no tratados con Simvastatina[®], tiende a disminuir en el tiempo, mientras que en animales sanos bajo las mismas condiciones de tratamiento los valores se mantienen relativamente constantes. Mediante un análisis de varianza se estableció que estas diferencias no son estadísticamente significativas (valor P=0,0877 para el colesterol total, Tabla 6 del apéndice 1; valor P=0,2027 para el HDL, Tabla 7 del apéndice 1; valor P=0,2953 para el LDL, Tabla 8 del apéndice 1).

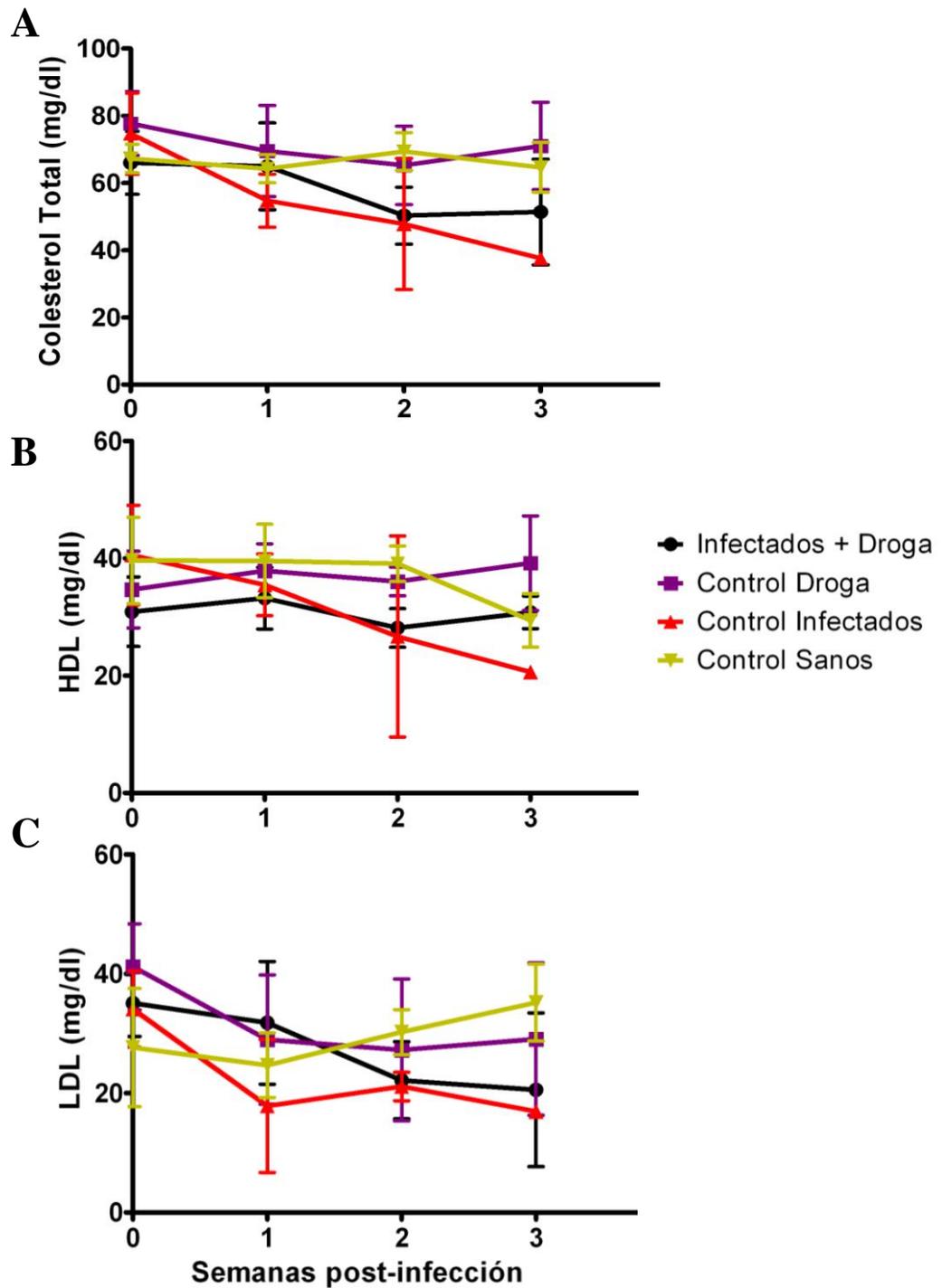


Figura 11: Niveles de colesterol total, HDL y LDL en plasma de los animales en estudio. En esta figura se aprecia las concentraciones del colesterol total (A), HDL (B) y LDL (C) en sangre de los animales experimentales de cada grupo con su respectiva desviación estándar (Infectados + droga en negro, control droga en morado, control infectados en rojo y control sanos en color mostaza) determinada diariamente una vez realizada la infección e iniciado el tratamiento con Simvastatina®. Se trabajó con una muestra de 8 animales por grupo (n=8).

En cuanto a las proporciones de HDL y LDL en plasma, se encontró que las mismas no presentan diferencias estadísticamente significativas (Tabla 1; valor P=0,9185 para %HDL, Tabla 9 del apéndice 1; valor P=0,8818 para %LDL, Tabla 10 del apéndice 1).

Tabla 1: Porcentaje de las lipoproteínas de alta y baja densidad (HDL y LDL respectivamente) con respecto al colesterol total en plasma de los animales experimentales de cada grupo determinada diariamente una vez realizada la infección e iniciado el tratamiento con Simvastatina®. Se trabajó con una muestra de 8 animales por grupo (n=8).

| | | Semanas post-infección | | | |
|------|--------------------|------------------------|-------|-------|-------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 |
| %HDL | Grupo Experimental | 46,71 | 52,08 | 56,57 | 62,03 |
| | Control Droga | 45,57 | 57,4 | 57,39 | 57,81 |
| | Control Infectados | 54,23 | 66,78 | 52,91 | 54,88 |
| | Control Sanos | 59,34 | 61,54 | 56,48 | 45,7 |
| %LDL | Grupo Experimental | 53,27 | 47,98 | 43,43 | 37,97 |
| | Control Droga | 54,4 | 42,6 | 42,61 | 42,19 |
| | Control Infectados | 45,77 | 30,77 | 47,09 | 45,12 |
| | Control Sanos | 40,66 | 38,46 | 43,52 | 54,3 |

Determinación de la concentración de colesterol en parásitos provenientes de animales infectados experimentalmente con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina®.

La concentración y composición de los lípidos neutros de parásitos purificados a partir de animales infectados experimentalmente con *T. evansi* tratados y no tratados con Simvastatina® se evaluó a través de dos métodos: microscopía de fluorescencia (tinción con Filipina y Rojo de Nilo para marcar colesterol no esterificado y lípidos respectivamente), y mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas de la fracción de esteroides de los parásitos.

Mediante microscopía de fluorescencia se pudieron detectar cambios en el patrón de distribución de colesterol no esterificado y lípidos polares en parásitos purificados de sangre de animales infectados experimentalmente con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina[®].

Entre los días 8 y 22 post-infección se observa una reducción a la mitad en la intensidad máxima asociada a colesterol no esterificado medida en parásitos del grupo infectados + droga (B y D en la Figura 12), a diferencia del grupo control infectados cuyo patrón de marcaje en ambos puntos es similar (A y C en la Figura 12).

De la misma manera, a los 22 días post-infección la fluorescencia asociada a lípidos polares en los parásitos es mayor que a los 8 días post-infección en ambos grupos experimentales, indicándose a su vez la acumulación de los mismos en algunas zonas de *T. evansi*, a pesar del tratamiento con la droga (Figura 13).

En la Figura 14 se encuentran imágenes de los parásitos por contraste de fase, donde se aprecia una aparente integridad de los mismos. Además, se muestra la composición entre los marcajes con Filipina y Rojo de Nilo de cada grupo experimental para los días 8 y 22 post-infección.

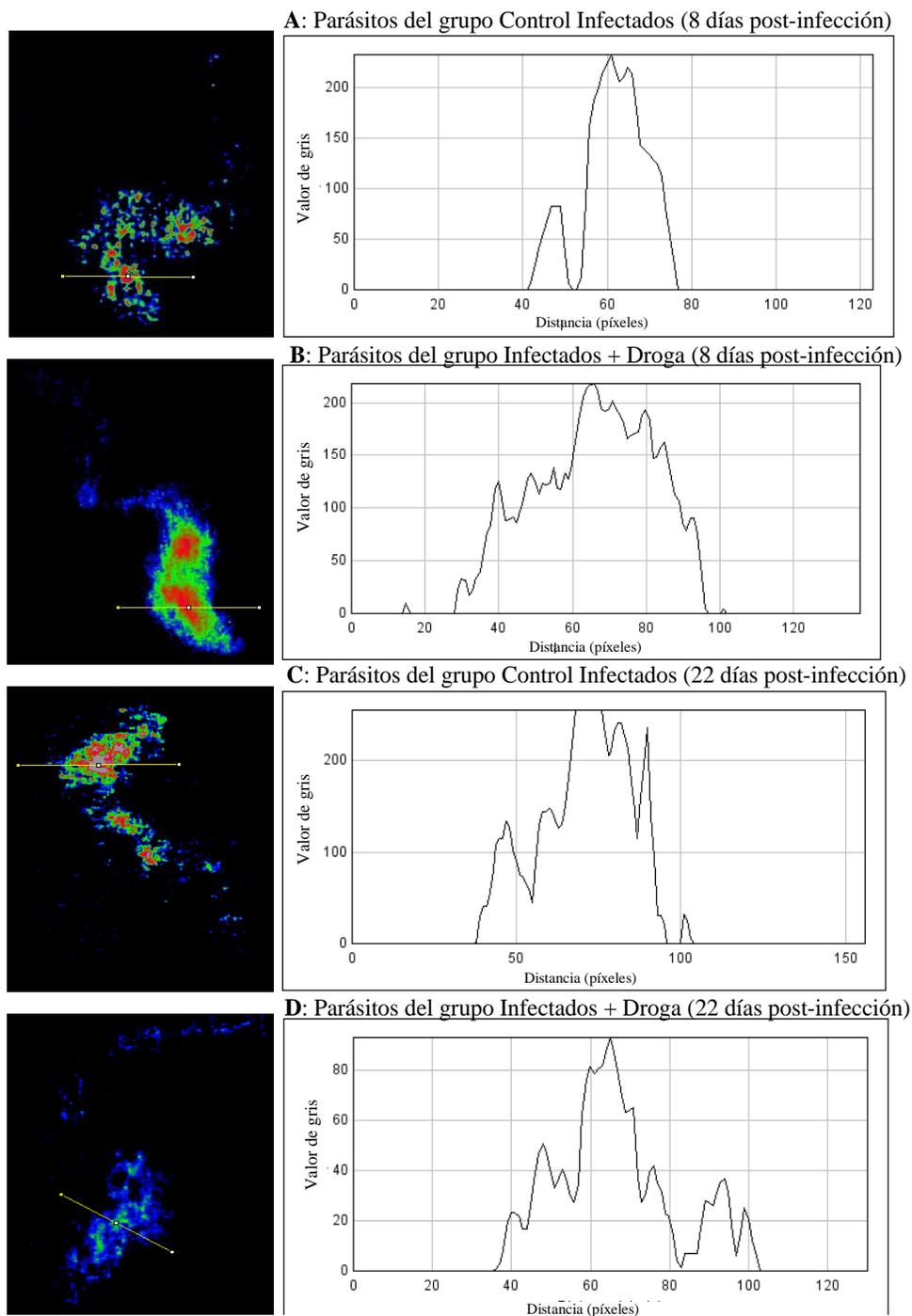


Figura 12: Parásitos purificados de sangre de animales infectados experimentalmente con *Trypanosoma evansi*, tratados o no con Simvastatina[®], teñidos con Filipina. En la columna izquierda se encuentra una imagen del parásito en pseudocolor, y a la derecha el histograma correspondiente a la línea trazada en cada imagen, indicando el valor de grises (intensidad de la fluorescencia) Vs distancia en píxeles de la línea. Se trabajó con una muestra de 3 animales por grupo por día (n=3).

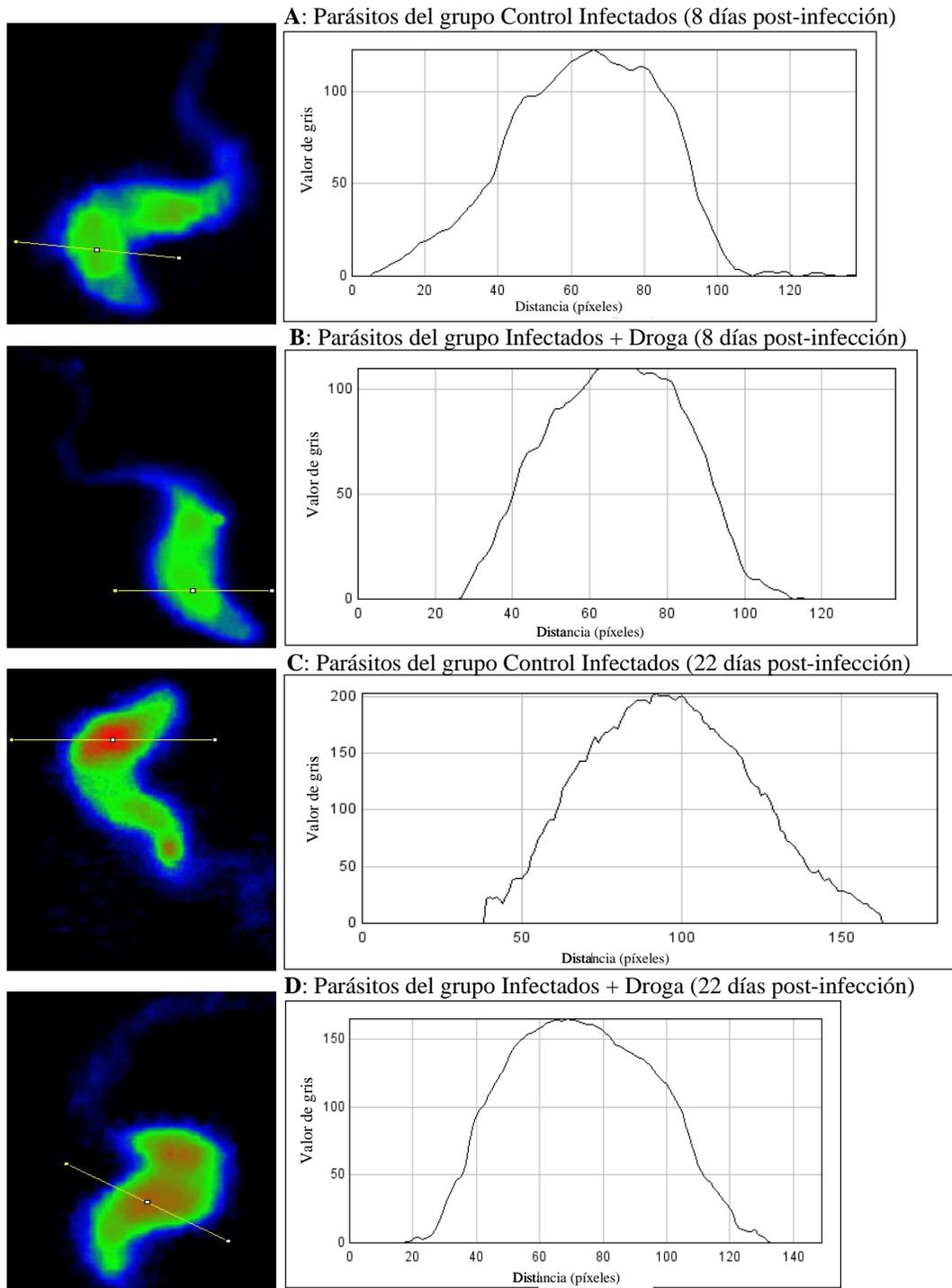


Figura 13: Parásitos purificados de sangre de animales infectados experimentalmente con *Trypanosoma evansi*, tratados o no con Simvastatina[®], teñidos con Rojo de Nilo. En la columna izquierda se encuentra una imagen del parásito en pseudocolor, y a la derecha el histograma correspondiente a la línea trazada en cada imagen, indicando el valor de grises (intensidad de la fluorescencia) Vs distancia en píxeles de la línea. Se trabajó con una muestra de 3 animales por grupo por día (n=3).

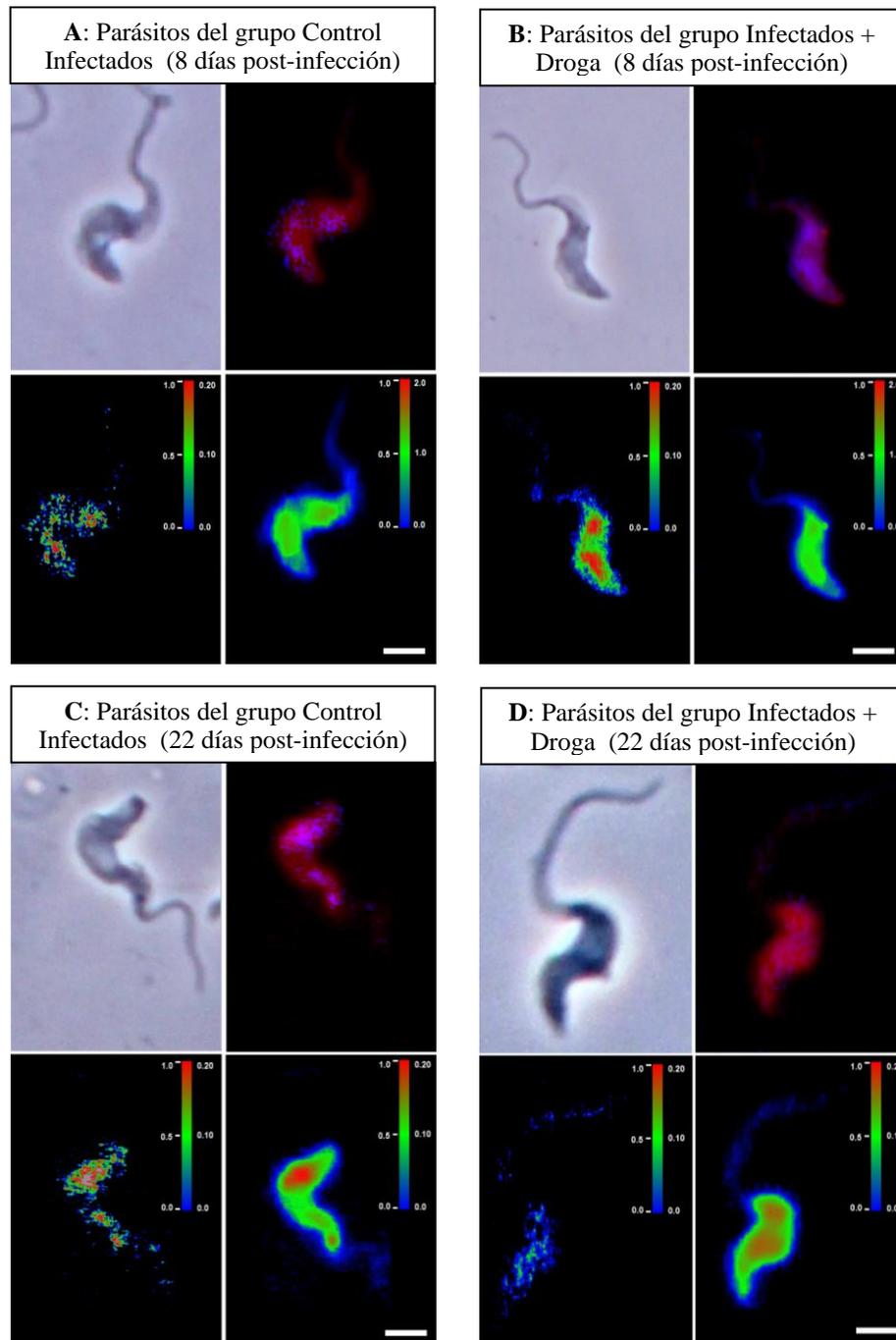


Figura 14: Parásitos purificados de sangre de animales infectados experimentalmente con *Trypanosoma evansi*, teñidos con Filipina y Rojo de Nilo. En la parte superior izquierda de cada set de fotografías se encuentra una imagen del parásito tomada en contraste de fases, en la parte superior derecha una composición de la tinción realizada con las dos sondas, en la parte inferior se muestra en pseudocolor la tinción con filipina (izquierda) y rojo de Nilo (derecha), mostrando a su vez una escala de referencia de la intensidad de fluorescencia para cada uno. La barra blanca es referencia a 2 μ m. Se trabajó con una muestra de 3 animales por grupo por día (n=3).

A su vez, se estudió la concentración y composición de los lípidos neutros de parásitos purificados a partir de animales infectados experimentalmente con *T. evansi* tratados y no tratados con Simvastatina[®] mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de gases, encontrándose que el colesterol está presente en una proporción del 99%, donde el 1% restante son derivados del compuesto. En las Figuras 16 y 17 se puede apreciar solo un pico significativo en los cromatogramas de cada grupo, el cual corresponde al colesterol.

Por otra parte, se realizó la cuantificación del colesterol total presente en los parásitos de cada grupo (control infectados e infectados + droga), donde se encontró que en el grupo control la cantidad de colesterol disminuye de forma casi lineal en el tiempo, pasando de un valor de 0,045µg/dL en el día 10 a uno de 0,004µg/dL en el día 22; mientras que en grupo tratado (Infectados + droga), la disminución en el tiempo no es tan dramática; sin embargo es destacable que la cantidad de colesterol total en este grupo en el día 10 (0,02µg/dL) corresponde a la mitad de la cantidad encontrada en el grupo control el mismo día (Figura 15). Las variaciones encontradas en el tiempo y entre los grupos experimentales fueron estadísticamente significativas (valor $P < 0,05$; ver Tabla 11, apéndice 1).

No se obtuvieron parásitos para la determinación de los esteroides en el día 8 debido a la baja carga parasitaria de los animales infectados.

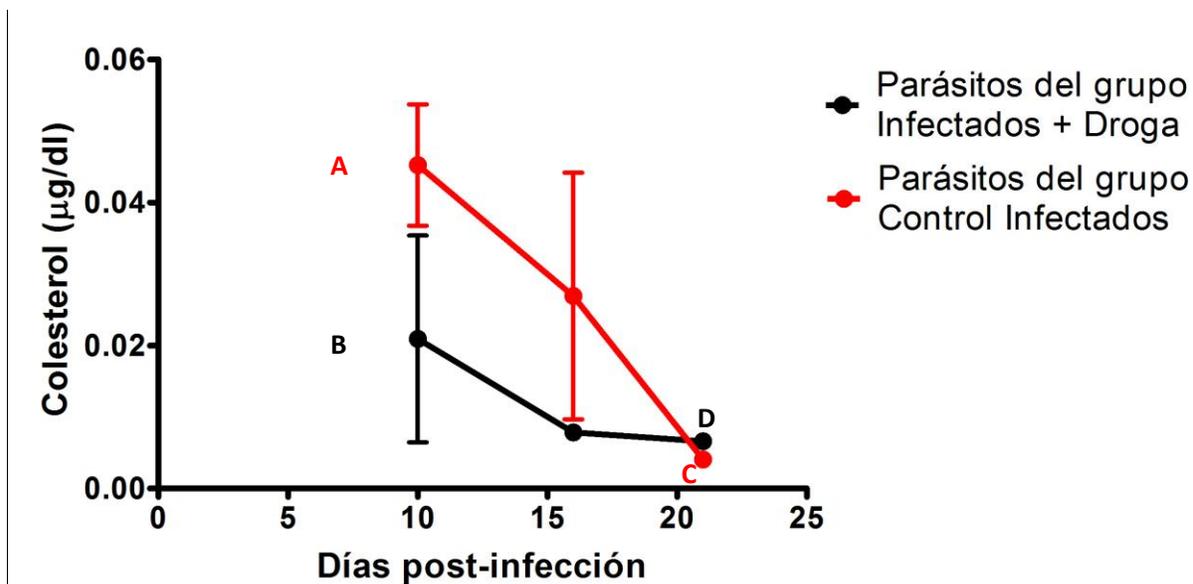


Figura 15: Concentración de colesterol en parásitos purificados de sangre de animales infectados experimentalmente tratados y no tratados con Simvastatina®, determinado por cromatografía de gases. Las letras A, B, C y D indican los puntos en los que se tomaron las fotografías mostradas en las Figuras 18, 19 y 20. Se trabajó con una muestra de 3 animales por grupo por día (n=3).

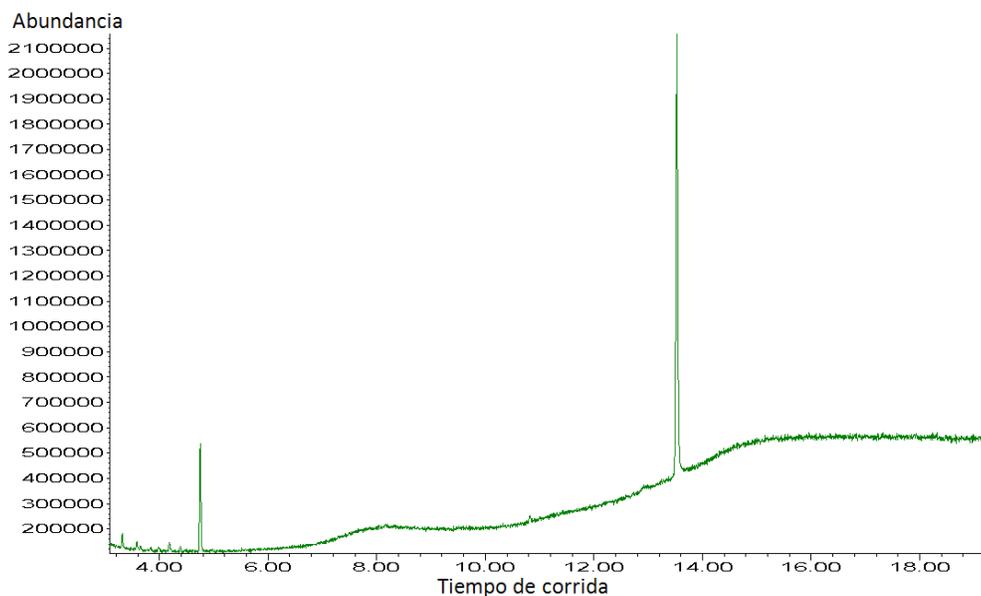


Figura 16: Cromatograma de la fracción de esteroides extraída de parásitos purificados del grupo control.

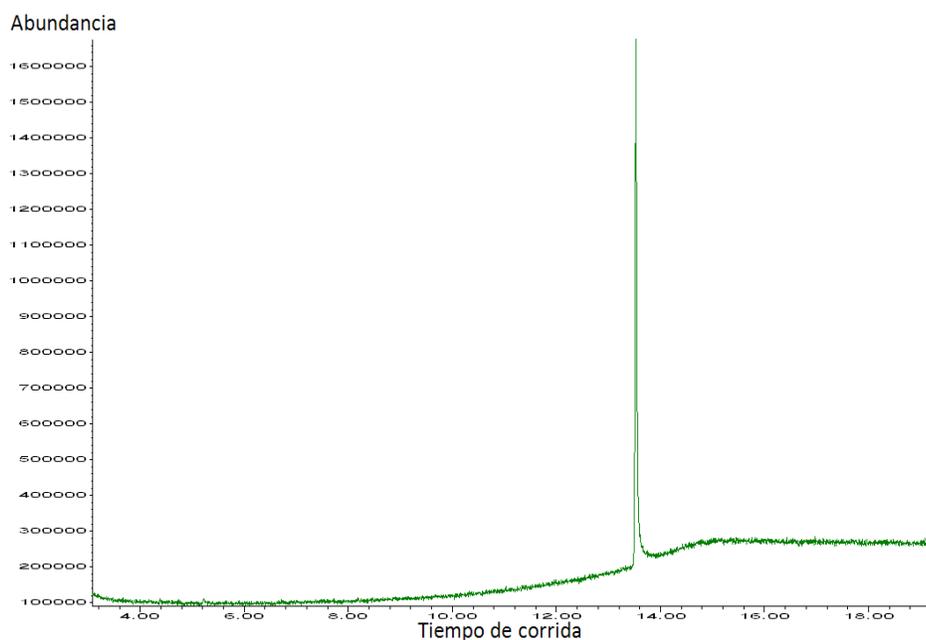


Figura 17: Cromatograma de la fracción de esteroides extraída de parásitos purificados del grupo infectados + droga.

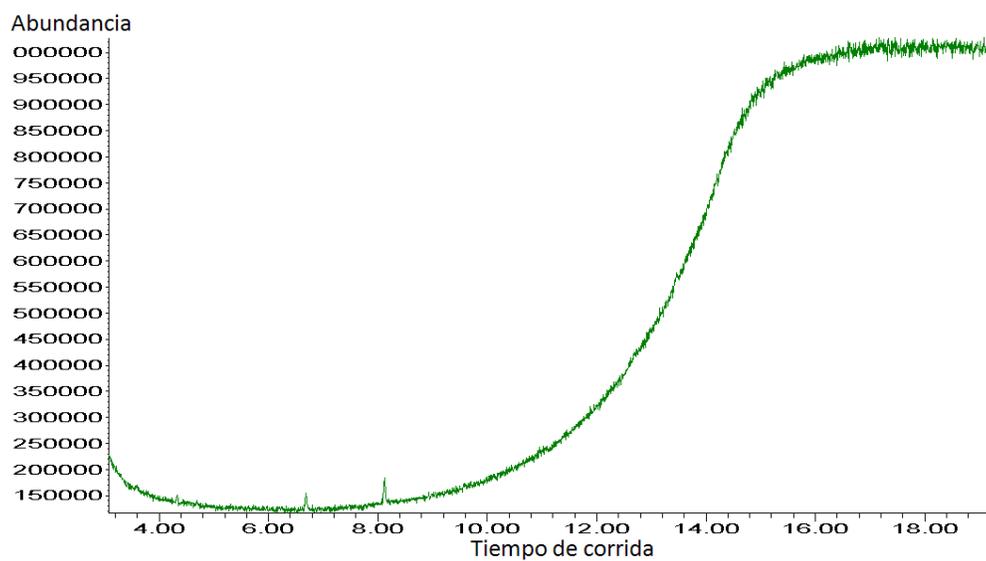


Figura 18: Cromatograma control (corrida de los solventes empleados en la extracción de esteroides).

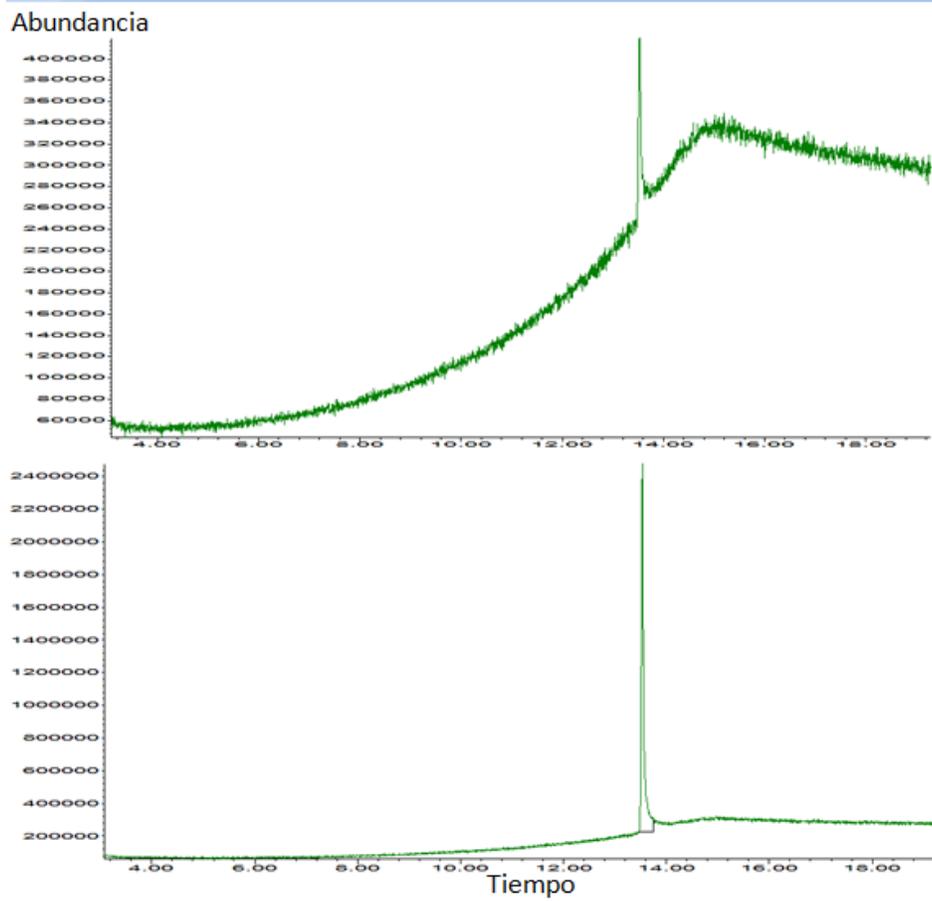


Figura 19: Cromatogramas del patrón de colesterol empleado para la cuantificación del compuesto en las fracciones de esteroides extraídas de parásitos purificados de los grupos control infectados e infectados + droga. En la parte superior se puede observar la corrida cromatográfica del patrón a una concentración de 0,01mg/dL (concentración menor), mientras que en la inferior se encuentra a 0,03mg/dL (concentración mayor).

8. DISCUSIÓN

Las rutas de biosíntesis de lípidos neutros en *Trypanosoma evansi* son desconocidas, así como su importancia en términos de viabilidad y virulencia del parásito. Debido a esto, en el presente trabajo especial de grado se planteó determinar el efecto de la Simvastatina[®] en la concentración de lípidos neutros de *Trypanosoma evansi* en animales infectados experimentalmente.

La Simvastatina[®] es una droga que inhibe la HMG-CoA reductasa, enzima limitante en el proceso de control de la velocidad de la vía del mevalonato, por lo cual es estrictamente regulada. Esta enzima es encontrada tanto en mamíferos como en tripanosomátidos, donde la diferencia en la ruta de biosíntesis de esteroides radica en la conversión del lanosterol a colesterol o ergosterol (Sealey, 2007). Por esta razón, la Simvastatina[®] es de gran utilidad para el estudio de estos parásitos, dado que permite la alteración de la biosíntesis de esteroides tanto en el animal infectado (alterando así la composición de esteroides en sangre), como en el parásito (en caso de presentar esta ruta de biosíntesis).

En los animales experimentalmente infectados con *T. evansi* tratados con una dosis de 40mg/Kg/día de Simvastatina[®] hubo un incremento importante de la sobrevivencia (Figura 9). Sin embargo, no se evidenciaron cambios en los niveles de parasitemia con ninguno de los métodos empleados para su determinación (Herbert y Lumsden, 1976; conteo por cámara de Neubauer). El grupo tratado con 20mg/Kg/día no presentó cambios significativos con respecto al grupo control ni en la sobrevivencia ni en la carga parasitaria.

Estos resultados en conjunto hacen suponer que existe una pérdida de viabilidad y/o virulencia de estos parásitos debido al tratamiento con Simvastatina[®], de esta manera la sobrevivencia del hospedero se alarga a pesar de que la carga parasitaria se mantiene a niveles entre 10^8 y 10^9 parásitos/mL desde el día 16 post-infección. Un efecto similar ha sido reportado para epimastigotes de *T. cruzi* tratados con ketoconazol y las formas procíclicas de *T. brucei* tratadas con simvastatina en un medio carente de lípidos, en los cuales se observó una pérdida de viabilidad atribuida a una alteración de la estructura y función del sistema kinetoplasto-mitocondria (Coppens y Courtoy, 1995).

Dicha pérdida de viabilidad puede deberse a la alteración en la constitución de esteroides de la membrana de los parásitos. En *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania* sp. se ha reportado que la fuente, proporción y composición de esteroides en las membranas dependen de la etapa del ciclo de vida en la que se encuentren. En las formas propias del vector (tripomastigotes procíclicos para *T. brucei*, epimastigotes en *T. cruzi* y promastigotes en *Leishmania* sp.) se encuentra una cantidad significativa de ergosterol y sus derivados, los cuales son sintetizados *de novo* en los parásitos y presentan un papel regulatorio en el metabolismo. Al infectar al hospedador mamífero en forma de tripomastigotes (forma presente en el torrente sanguíneo), las proporciones cambian: el ergosterol se encuentra desplazado por esteroides del hospedador, donde el colesterol puede llegar hasta un 50% en *Leishmania* y *T. cruzi* y en *T. brucei* es reportado como el esteroide mayoritario en la membrana (Coppens y Courtoy, 1995; Sealey, 2007). En esta forma, los parásitos se dividen rápidamente aprovechando los nutrientes del exterior tales como lipoproteínas ricas en colesterol (LDL y HDL), que son incorporadas de la sangre del animal infectado a través de endocitosis mediada

por receptores, debido a una ausencia aparente de la vía de síntesis endógena de ergosterol en esta forma del parásito (Quiroz, 1984; Coppens y Courtoy, 1995). Este mecanismo ha sido comprobado como un sistema altamente conservado en el orden Kinetoplastida (Bastin y col., 1996). De forma similar, en *Trypanosoma evansi* la composición de esteroides en la membrana está representada en un 99% por colesterol (datos aún no publicados).

Al ser el colesterol y sus derivados los únicos esteroides encontrados en *T. evansi*, es posible que durante su ciclo de vida requiera de la obtención de este compuesto a partir del medio, puesto que no se han encontrado reportes de parásitos que sinteticen esta molécula. Shrivastava y Chattopadhyay (2007) indican que el colesterol está presente de forma ubicua en las células de mamíferos, mientras que en eucariotas inferiores el esteroide más común es el ergosterol, indicando a su vez que este último podría ser un precursor evolutivo del primero (Shrivastava y Chattopadhyay, 2007). Debido a esto, la posible pérdida de viabilidad y/o virulencia de estos parásitos que conlleva a una mayor sobrevida de los animales infectados experimentalmente bajo tratamiento con Simvastatina[®] puede corresponder a: (1) una acción de la droga sobre el hospedero, produciendo una disminución en la síntesis de colesterol debido a la inhibición alostérica de la HMG-CoA reductasa, lo cual alteraría la producción de moléculas de LDL y HDL, modificando a su vez los niveles y la disponibilidad de estos compuestos en sangre; y (2) una acción de la droga sobre el parásito.

De forma de comprobar la atribución de la acción de la Simvastatina[®] sobre el hospedero (efecto 1), se realizaron determinaciones de las concentraciones de colesterol total, HDL, LDL y sus proporciones relativas en el plasma de las ratas de cada grupo, pero no se

encontraron diferencias significativas entre el grupo Infectados + droga y los controles, aunque se observa una tendencia a disminuir estos valores por causa de la infección y no por acción de la droga (Figuras 12-16; apéndices 6-10).

En estudios realizados en cabras, vacas, ovejas y cerdos infectados naturalmente con tripanosomas se reportó una disminución en la concentración total de colesterol, LDL y HDL en plasma. Dicha alteración en los niveles de lípidos es atribuible a la severidad de la infección, puesto que puede ser un factor contribuyente a la merma de los mismos (Biryomumaisho y col., 2003; Adamu y col., 2009). Sin embargo, en caballos y camellos hembras embarazadas infectados naturalmente con *T. evansi* se reporta un incremento significativo en el nivel del colesterol total en suero, con respecto a los valores en animales sanos, encontrándose además que en caballos hay una elevación de los niveles de LDL y HDL en sangre (Megahed y col., 2010; Sazmand y col., 2011).

De igual manera, en conejos y ratas infectados experimentalmente con tripanosomas, los niveles de LDL y colesterol del plasma incrementaron progresivamente en el tiempo, encontrándose que el nivel de las HDL en conejos infectados con *T. gambiense* se eleva, mientras que en la infección con *T. brucei* es significativamente reducido (Biryomumaisho y col., 2003; Orhue y Nwanze, 2006). Este incremento en los valores de lípidos en sangre del hospedero puede estar de alguna forma relacionado con la dependencia del parásito al colesterol y a los lípidos durante su crecimiento, puesto que un balance energético negativo se desarrolla durante el estrés provocado por la infección, forzando al animal a obtener los requerimientos metabólicos de sus propios tejidos, como movimiento del tejido adiposo con

una elevación resultante en los niveles de lipoproteínas de la sangre (Biryomumaisho y col., 2003; Ranjithkumar y col., 2012).

La discrepancia en los niveles de lípidos en sangre puede atribuirse a diferencias metabólicas entre las especies de animales y/o diferencias en la carga parasitaria y tiempo de la infección. Por ello se sugiere que los animales bajo este estudio presentaron una compensación metabólica que no permitió observar cambios en los niveles de colesterol total, HDL y LDL.

A fin de determinar si la Simvastatina[®] tuvo un efecto sobre los parásitos (efecto 2), se realizó una determinación de la composición de esteroides de la cepa TeAp-ElFrio01 de *Trypanosoma evansi* en los días 10, 16 y 22 post-infección, en el grupo control y el grupo tratado, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas, corroborándose que el esteroide mayoritario en *T. evansi* es el colesterol. A los 10 días post-infección los parásitos purificados a partir de sangre de animales tratados presentaron una disminución del 50% en la concentración de colesterol con respecto a los parásitos provenientes de animales no tratados, y estos valores continúan disminuyendo al transcurrir el tiempo en ambos grupos, hasta alcanzar concentraciones similares en el día 22 post-infección (Figura 15).

Zhou y colaboradores (2007) indican que *T. brucei* puede acumular una alta cantidad de colesterol humano, sin estar inhibida por completo la vía de síntesis de ergosterol (presente tanto en la forma sanguínea como en la forma procíclica). De esta forma, estos parásitos han

logrado algún nivel de auxotrofia, en donde sus esteroides tienen dos funciones: una estructural, que puede ser satisfecha por esteroides exógenos, y otra metabólica (como la señalización celular para el crecimiento) para la cual tienen requerimientos más estrictos, satisfechos solo por biosíntesis, recalándose así la importancia del ergosterol en niveles hormonales (Coppens y col., 1995a, Sealey, 2007; Zhou y col., 2007). En *Leishmania* también se reporta un requerimiento constante de la síntesis *de novo* de esteroides específicos tales como episterol y 5-dehidroepisterol para su crecimiento y viabilidad (Rodrigues y col., 2005).

Las tendencias observadas de los niveles de colesterol en el tiempo, así como el hecho de que su proporción con respecto a otros esteroides no es alterada en el curso del estudio, indican que aparentemente *T. evansi* no presenta un mecanismo compensatorio en respuesta a la disminución del colesterol endógeno, efecto observado para ambos grupos; además, este parásito no parece requerir de otro tipo de esteroides para sobrevivir. No obstante, la droga evidentemente afecta a *Trypanosoma evansi*, puesto que se encontró que la concentración de colesterol en los parásitos provenientes del grupo tratado en el día 10 post-infección, representa la mitad de la correspondiente al control en el mismo punto (Figura 15).

Por otra parte, mediante el uso del antibiótico macrólido Filipina y el compuesto Rojo de Nilo, se realizó el marcaje del colesterol no esterificado y lípidos polares de *Trypanosoma evansi*, respectivamente. Obteniéndose cambios en el patrón de distribución del colesterol no esterificado y de los lípidos polares en los parásitos purificados de sangre de animales infectados experimentalmente con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina[®], donde entre el día 8 y el día 22 post infección en el grupo proveniente de

animales tratados se aprecia una reducción a la mitad de la intensidad del marcaje, mientras que en los parásitos control el patrón de marcaje en ambos puntos fue similar (Figura 12).

Este cambio en la distribución del colesterol puede deberse a la formación o disociación de placas citoplasmáticas de lípidos, las cuales están constituidas por lípidos neutros (usualmente triacilgliceroles y ésteres de colesterol), sirviendo como reservas de energía en ácidos grasos y de almacenamiento del colesterol celular en exceso (Greenspan y col., 1985).

De la misma manera, se puede apreciar que en el día 22 post-infección la fluorescencia asociada a lípidos polares en los parásitos es mayor que a los 8 días post-infección en ambos grupos, apreciándose a su vez la acumulación de los mismos en diferentes zonas de *T. evansi*. Es destacable que la intensidad de la fluorescencia (valores de gris) asociada a lípidos fue menor en el grupo de parásitos proveniente de animales tratados (Figura 13). Esto puede deberse a un mecanismo de compensación de *Trypanosoma evansi* consistente en: una síntesis *de novo* de algún(os) lípido(s) que contrarreste(n) el efecto de la pérdida de colesterol; o una incorporación de dichos lípidos a partir del medio, siendo este último un mecanismo de la forma sanguínea de *T. brucei* donde se reporta una incapacidad de síntesis de algunos lípidos y una dependencia estricta de los lípidos derivados de lipoproteínas para el ensamble de su membrana (Coppens y Courtoy, 2000).

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren una mayor atribución a una acción de la droga sobre *Trypanosoma evansi* (efecto 2), debido a la alteración en la

cantidad de colesterol en el parásito y la alteración de distribución de los lípidos, a pesar de la relativa normalidad de los niveles lipídicos en sangre.

Se debe resaltar que es la primera vez que se determina la composición de lípidos neutros de *Trypanosoma evansi*, así como su alteración por una droga comercial. El trabajo resultante es una base para el inicio de una nueva línea de investigación sobre este parásito. En el laboratorio de Fisiología de Parásitos del IVIC se continuarán realizando trabajos a fin de dilucidar los mecanismos por los cuales se producen los efectos antes descritos sobre *T. evansi*, cuya comprensión podría llevar al desarrollo de nuevas terapias.

9. CONCLUSIONES

- Una dosis de 40mg/Kg/día de Simvastatina[®] prolonga la sobrevivencia de los animales experimentalmente infectados con *T. evansi*, mientras que no tiene efecto alguno sobre la parasitemia encontrada en sangre, puesto que la misma se mantiene en niveles altos a pesar del tratamiento.
- No se observó una alteración significativa de los niveles de colesterol total, HDL, LDL y sus proporciones en plasma en los hospederos de los diferentes grupos experimentales en el tiempo durante el cual se realizó el presente estudio. Este hecho no concuerda con la bibliografía consultada puesto que existe un efecto comprobado de la Simvastatina[®] sobre estos valores, así como también se ha reportado una alteración en el metabolismo lipídico de los animales debido a la infección experimental con este parásito.
- Mediante microscopía de fluorescencia se detectaron cambios en los patrones de distribución de colesterol no esterificado y lípidos polares (marcados con Filipina y Rojo de Nilo, respectivamente) de parásitos purificados de sangre de animales infectados experimentalmente con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina[®]. Entre los días 8 y 22 post-infección se observa una reducción a la mitad en la intensidad máxima asociada a colesterol no esterificado medida en parásitos del grupo infectados + droga, a diferencia del grupo control infectados cuyo patrón de marcaje en ambos puntos es similar. De la misma manera, a los 22 días post-infección la fluorescencia asociada a lípidos polares en los parásitos es mayor que a los 8 días

post-infección en ambos grupos experimentales, indicándose a su vez la acumulación de los mismos en algunas zonas de *T. evansi* a pesar del tratamiento con la droga.

- Mediante un análisis por cromatografía de gases se comprobó que el colesterol está presente en el parásito en una proporción del 99%, siendo sus derivados los constituyentes del 1% restante. En la cuantificación del colesterol total presente en los parásitos se encontró en el grupo tratado que la concentración de este compuesto constituye el 50% del encontrado en el grupo control.

Los resultados obtenidos en este trabajo especial de grado sugieren que existe una acción de la Simvastatina[®] sobre *Trypanosoma evansi*, lo cual deriva en una disminución de la cantidad de colesterol en el parásito y en una alteración de la distribución de los lípidos, a pesar de la relativa normalidad de los niveles lipídicos en sangre.

10. BIBLIOGRAFÍA

- **Andrade-Neto, V., Cicco, N., Ferreira, E., Canto-Cavalheiro, M., Correa, G., Torres-Santos, E.** 2011. The pharmacological inhibition of sterol biosynthesis in *Leishmania* is counteracted by enhancement of LDL endocytosis. *Acta Trop.* **119**: 194-198.
- **Adamu, S., Barde, N., Abenga, J., Useh, N., Ibrahim, N., Esievo, K.** 2009. Experimental *Trypanosoma brucei* infection-induced changes in the serum profiles of lipids and cholesterol and the clinical implications in pigs. *J Cell Anim Biol.* **3**(2):015-020.
- **Bastin, P., Stephan, A., Raper, J., Saint-Remy, J., Opperdoes, F., Courtoy P.** 1996. An Mr 145000 low density lipoprotein (LDL)-binding protein is conserved throughout the Kinetoplastida order. *Mol. Biochem. Parasit.* **76**: 43-56.
- **Biryomumaisho, S., Katunguka-Rwakishaya, E., Rubaire-Akiiki.** 2003. Serum biochemical changes in experimental *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* infection in small east Africa goats. *Veterinarski Archiv.* **73**(3):167-180.
- **Bowman, R., Wolf, R.** 1962. A rapid and specific ultramicro method for total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **8**: 302-309.
- **Camargo, R., Uzcanga, G., Bubis, J.** 2004. Isolation of two antigens from *trypanosoma evansi* that are partially responsible for its cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Vet. Parasitol.* **123**: 67-81.
- **Camejo, G., Cortez, M., López, C., Mosquera, B.** 1981. Photometric measurement of lipoprotein-cholesterol after agarose electrophoresis: comparison with the single-spin ultracentrifugal analysis. *Clin. Chim. Acta.* **111**: 239-245.
- **Canelón, J., Meléndez, R.** 2003. Posible origen del *Trypanosoma evansi* en Venezuela. *Vet. Trop.* **28**(2): 155-167.
- **Coppens, I., Bastin, P., Levade, T., Courtoy, P.** 1995a. Activity, pharmacological inhibition and biological regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasit.* **69**: 29-40.
- **Coppens, I., Bastin, P., Opperdoes, F., Baudhuin, P., Courtoy, P.** 1992. *Trypanosome brucei brucei*: antigenic stability of its LDL-receptor and immunological cross-reactivity with the ldl receptor of the mammalian host. *Exp. Parasitol.* **74**: 77-86.
- **Coppens, I., Baudhuin, P., Opperdoes, F., Courtoy, P.** 1988. Receptors for the host low density lipoproteins in the hemoflagellate *Trypanosoma brucei*: Purification and involvement in the growth of the parasitic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 6753-6757.

- **Coppens, I., Courtoy, P.** 1995. Exogenous and endogenous sources of sterols in the cultured-adapted procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasit.* **73**: 179-188.
- **Coppens, I., Courtoy, P.** 2000. The adaptative mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 129–156.
- **Coppens, I., Levade, T., Courtoy, P.** 1995b. Host Plasma Low Density Lipoprotein Particles as an Essential Source of Lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **270**(11): 5736-5741.
- **Coppens, I., Opperdoes, F., Courtoy, J., Baudhuin, P.** 1987. Receptor-mediated endocytosis in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J. Protozool.* **34**(4): 465-473.
- **Coppo, N., Coppo, J., Lazarte, M.** 2003. Intervalos de confianza para colesterol ligado a lipoproteínas de alta y baja densidad en suero de bovinos, equinos, porcinos y caninos. *Rev. Vet.* **14**: 6-10.
- **Fowler, S., Greenspan, P.** 1985. Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O. *J Histochem Cytochem.* **33**: 833.
- **Gállego, J.** 2007. Manual de Parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Publicacions I Edicions de la Universitat de Barcelona. Barcelona, España.
- **García, F., Rivera, M., Ortega, M., Suárez, C.** 2000. Trypanosomiasis equina causada por *Trypanosoma evansi* en tres hatos ganaderos del Estado Apure, Venezuela. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV.* **41**(4): 91-100.
- **Greenspan, P., Mayer, E., Fowler, S.** 1985. Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol.* **100**:965-973.
- **Herbert W., Lumsden W.** 1976. *Trypanosoma brucei*: A Rapid “Matching“ Method for Estimating the Host’s Parasitemia. *Exp. Parasitol.* **40**: 427-431.
- **Hoare, C.** 1972. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications. Oxford, United Kingdom.
- **Jasinska, M., Owczarek, J., Orszulak-Michalak, D.** 2007. Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol. Rep.* **59**: 483-499.
- **Lanham, S., Godfrey, D.** 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* **28**: 521-534.

- **Makino, A., Ishii, K., Murate, M., Hayakawa, T., Suzuki, Y., Suzuki, M., Ito, K. y col.** 2006. *D-threo*-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol alters cellular cholesterol homeostasis by modulating the endosome lipid domains. *Biochem.* **45**: 4530-4541.
- **Martínez, F., Espinosa-García, M., Maldonado, G., Uribe, A., Flores, O., Milán, R., García, C.** 2001. El colesterol es esencial en el desarrollo embrionario y en el crecimiento celular. *Rev. Fac. Med. UNAM.* Vol **44**:168-176.
- **Megahed, G., Abd Ellah, M., Abdel-Rady, A.** 2010. Comparative biochemical studies on natural *Trypanosoma evansi* infections on she-camels. *Comp Clin Pathol.*
- **Orhue, N., Nwanze, E.** 2006. *Scoparia dulcis* reduces the severity of *Trypanosoma brucei*-induced hyperlipidaemia in the rabbit. *African J Biotechnol.* **5**(10):883-887.
- **Pecht, D., Litz, D., Bregman, C., Durham, S., Mense, M.** 2007. Nile red Staining as a sentinel screen for phospholipids. *Histologic®.* Vol. **XI**, No. **2**.
- **Pereira, M., Nakayasu, E., Sant'Anna, C., De Cicco, N., Atella, G., De Souza, W., Almeida, I. y col.** 2011. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions. *PLoS ONE.* **6**(7): 22359.
- **Perrone, T., Gonzatti, M., Villamizar, G., Escalante, A., Aso, P.** 2009. Molecular profiles of Venezuelan isolates of *Trypanosoma* sp. by random amplified polymorphic DNA method. *Vet. Parasitol.* **161**: 194–200.
- **Quiroz, H.** 1984. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa. Ciudad de México, México.
- **Ranjithkumar, M., Malik, T., Saxena, A., Dan, A., Dey, S.** 2012. Hyperlipidaemia in trypanosomiasis of naturally infected horses: possible cachexia–anorexia syndrome?. *Trop Anim Health Prod.*
- **Rodrigues, J., Urbina, J., De Souza, w.** 2005. Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol.* **111**:230–238.
- **Sazmand, A., Rasooli, A., Nouri, Hamidinejat, H., Hekmatimoghaddam, S.** 2011. Serobiochemical alterations in subclinically affected dromedary camels with *Trypanosoma evansi* in Iran. *Pak Vet J.* **31**(3):223-226.
- **Shegokar, V., Powar, R., Joshi, P., Bhargava, A., Dani, V., Katti, R., Zare, V. y col.** 2006. Short Report: human tripanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in a village in

India: preliminary serologic survey of the local population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75(5)**: 869-870.

- **Shrivastava, S., Chattopadhyay, A.** 2007. Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics using different fluorescent reporter probes. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **356**: 705–710.
- **Tserng, K., Griffin, R.** 2003. Quantitation and molecular species determination of diacylglycerols, phosphatidylcholines, ceramides, and sphingomyelins with gas chromatography. *Anal. Biochem.* **323**: 84-93.
- **Vanhollebeke, B., Truc, P., Poelvoorde, P., Pays, A., Joshi, P., Katti, R., Jannin, J. y col.** 2006. Human *Trypanosoma evansi* infection linked to a Lck of apolipoprotein L-I. *N Engl J Med.* **355**: 2752-2756.
- **Zhou, W., Cross, G., Nes, W.** 2007. Cholesterol import fails to prevent catalyst-based inhibition of ergosterol synthesis and cell proliferation of *Trypanosoma brucei*. *J. Lipid Res.* **48**:665-673.

Revistas electrónicas:

- **Boada-Sucre, A., Rossi, M., De Stefano, H., Sigales, L., González-Elorriaga, M.** 2004. Alteraciones en el patrón de enlazamiento de lectinas en el riñón de ratones infectados experimentalmente con una cepa venezolana de *Trypanosoma evansi*. *Revista Científica, FCV-LUZ*. Vol. **XIV**, N° **5**, 431 - 439. <http://www.saber.ula.ve>. [consulta: 10-01-2012].
- **Espinoza, E., González, N., Primera, G., Desquesnes, M., Hidalgo, L.** 1997. Sobrevivencia del *Trypanosoma vivax* (cepa I IV) y *Trypanosoma evansi* (cepa teval) en condiciones experimentales. *Vet. Trop.* **22(2)**: 189-194. http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/VeterinariaTropical/vt2202/texto/eespinoza.htm. [consulta: 15-10-2011].
- **Espinosa, F., Figueroa, R. Torres, F. Barriaga, G. Castillo, N., Espinosa, O.** 1998. PAC[®] Infecto-1. Primera Edición. Intersistemas, S.A de C.V. Ciudad de México, México. http://www.drscope.com/pac/infecto-1/a5/in1a5_p18.htm. [consulta: 01-03-2012].
- **Forlano, M., Meléndez, R., Canelón, J.** 2011. Seropositividad a *Trypanosoma Evansi* en caballos criollos infectados naturalmente en tres hatos del Estado Apure. *Revista Científica, FCV-LUZ*. Vol. **XXI**, N° **2**, 131 – 136. <http://www.saber.ula.ve>. [consulta: 10-01-2012].
- **Gerlach, H., Laumann, V., Martens, S., Becker, C., Goody, R., Geyer, M.** 2010. HIV-1 Nef membrane association depends on charge, curvature, composition and sequence. *Nat.*

Chem. Biol. **6**: 46-53. <http://www.nature.com/nchembio/journal/v6/n1/images/nchembio.268-comp8.gif>. [consulta: 25-04-2012].

- **Hernández-Alcántara, G.** 2003. En busca de nuevos fármacos contra algunos tripanosomátidos. *REB.* **22**(1): 19-24. http://www.uacj.mx/ICB/RedCIB/REB/2003/03/REB2003-1_EN%20BUSCA%20DE.pdf. [consulta: 01-03-2012].
- **Molina, M., Vázquez, C., Ruíz, V.** 1991. Metabolismo del colesterol. Su regulación hepático e intestinal. *Grasas y Aceites.***42**(4): 298-308. <http://grasasyaceites.revistas.csic.es>. [consulta: 10-06-2011].
- **Ruiz, G., Juárez, I., Ramón, T., Rodríguez, A., Ble, J., Díaz, J.** 2008. Estudio del catabolismo del colesterol en ratas con dieta hipercolesterolémica a las que se coadministró estatina/diosgenina vs estatina/ezetimiba. *Semana de divulgación y video científico*. Pág. 373-377. <http://www.archivos.ujat.mx/dip/divulgacion%20y%20video%20cientifico%202008/DACS/GRuizH.pdf>. [consulta: 10-03-2011].
- **Sealey, M.** 2007. Importancia de la biosíntesis de ergosterol en la proliferación celular y en el mecanismo de acción de fármacos de tripanosomátidos. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Granada, España. <http://hera.ugr.es/tesisugr/16778108.pdf>. [consulta: 04-03-2012].
- **Toro, M.** 1987. Tripanosomiasis animal: Diagnóstico y Control. FONIAP Divulga No. 25. Instituto de Investigaciones Veterinaria. Maracay, Edo. Aragua. <http://sian.inia.gob.ve>. [consulta: 03-01-2012].
- **Uronen, R.** 2011. Sterol-binding proteins in late endosomes: regulation of endosome motility and lipid metabolism. University of Helsinki. [En línea] Disponible en: <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/24697/sterolbi.pdf?sequence=1> [consulta: 05-04-2011].
- **Womack, S., Tarpley, H., Little, S., Latimer, K.** 2006. *Trypanosoma evansi* in horses. Veterinary clinical pathology clerkship program. The University of Georgia. <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/womack/fig01.jpg> [consulta: 02-04-2011].

Otros recursos electrónicos:

- (1) Universidad de la República de Montevideo, Uruguay. Artrópodos Transmisores de Enfermedades. [En línea] Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy> [consulta: 02-02-2012].

- (2) **Parker, C.** 2011. Simvastatin (Zocor & Simvacor). Uses, Dosage, Side Effects, Interactions. [En línea] Disponible en: <http://www.drugsdb.com/rx/simvastatin/#ixzz1t90M76tf> [consulta: 05-04-2011].
- (3) Simvastatin. Cayman Chemical. [En línea] Disponible en: <http://www.caymanchem.com/pdfs/10010344.pdf> [consulta: 20-03-2012].
- (4) Parasite Museum. [En línea] Disponible en: <http://www.parasitemuseum.com/wp-content/gallery/trypanosome-life-cycle/trypanosoma-evansi.jpg> [consulta: 25-04-2012].
- (5) **Bastidas, O.** Conteo Celular con Hematocitómetro Uso Elemental del Hematocitómetro. Celeromics. [En línea] Disponible en: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf> [consulta: 05-08-2011].
- (6) **González, J.** Curso de Biomoléculas. Universidad del País Vasco. Disponible en: <http://www.ehu.es/biomoleculas/lipidos/jpg/lipoproteina.jpg> [consulta: 01-05-2012].
- (7) Simvastatina comprimidos recubiertos de 10mg-20mg-40mg-80mg. 2010. Instituto de Salud Pública de Chile. Disponible en: <http://www.ispch.cl/encabezado/folletos/doc/simvastatina%2010-20.pdf> [consulta: 10-05-2011].
- (8) Simvastatina. 2010. Drug Safety Update, MHRA. Vol. 3, N°10. Disponible en: <http://conamed.org/616.pdf> [consulta: 05-05-2011].
- (9) ZOCOR (simvastatin) Tablets. 2012. Merck Sharp & Dohme Ltd. Disponible en: http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/z/zocor/zocor_pi.pdf [consulta: 06-05-2011].

11. APÉNDICES

Apéndice 1. Pruebas estadísticas.

Tabla 2: Prueba estadística ANOVA de una vía con $P < 0,05$, sobre los datos de sobrevivida de los animales experimentalmente infectados con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina®.

| Valor P | F | ¿Estadísticamente Significativo? | | SS | df | MS |
|---------------|-------|----------------------------------|-------------|--------|-----|-------|
| 0,0005 | 8,062 | Si | Intergrupos | 24290 | 2 | 12140 |
| | | | Intragrupo | 189800 | 126 | 1506 |

Tabla 3: Prueba de comparación de Tuckey sobre los datos de sobrevivida de los animales experimentalmente infectados con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina®.

| | q | 95% CI | ¿Estadísticamente Significativo? |
|-----------------------------------|-------|-----------------|----------------------------------|
| Control vs 40mg/Kg/día | 4,120 | -44.25 a -4.521 | Sí |
| Control vs 20mg/Kg/día | 1,325 | -12.02 a 27.70 | No |
| 20mg/Kg/día vs 40mg/Kg/día | 5,445 | -52.09 a -12.36 | Sí |

Tabla 4: Prueba estadística ANOVA de una vía con $P < 0,05$, sobre los datos de parasitemia promedio mediante el método de Herbert y Lumsden (1976) en los animales experimentalmente infectados con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina®.

| Valor P | F | ¿Estadísticamente Significativo? | | SS | df | MS |
|---------------|-------|----------------------------------|-------------|-------|----|--------|
| 0,0519 | 3,099 | No | Intergrupos | 2,206 | 2 | 1,103 |
| | | | Intragrupo | 22,79 | 64 | 0,3560 |

Tabla 5: Prueba estadística T de Student de Mann Whitney con $P < 0,05$, sobre los datos de parasitemia promedio mediante el conteo por cámara de Neubauer en los animales experimentalmente infectados con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina®.

| Valor P | ¿Estadísticamente Significativo? | Valor U | Suma de rangos | |
|---------------|----------------------------------|---------|--------------------|-----|
| 0,2250 | No | 141,0 | Control Infectados | 363 |
| | | | Dosis 40mg/Kg/día | 417 |

Tabla 6: Prueba estadística ANOVA de una vía con $P < 0,05$, sobre los datos de colesterol total en animales sanos y animales experimentalmente infectados con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina®.

| Valor P | F | ¿Estadísticamente Significativo? | | SS | df | MS |
|---------------|-------|----------------------------------|-------------|-------|----|-------|
| 0,0877 | 2,766 | No | Intergrupos | 725,6 | 3 | 241,9 |
| | | | Intragrupo | 1049 | 12 | 87,45 |

Tabla 7: Prueba estadística ANOVA de una vía con $P < 0,05$, sobre los datos de niveles de HDL en animales sanos y animales experimentalmente infectados con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina®.

| Valor P | F | ¿Estadísticamente Significativo? | | SS | df | MS |
|---------------|-------|----------------------------------|-------------|-------|----|-------|
| 0,2027 | 1,789 | No | Intergrupos | 151,0 | 3 | 50,33 |
| | | | Intragrupo | 337,6 | 12 | 28,13 |

Tabla 8: Prueba estadística ANOVA de una vía con $P < 0,05$, sobre los datos de niveles de LDL en animales sanos y animales experimentalmente infectados con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina®.

| Valor P | F | ¿Estadísticamente Significativo? | | SS | df | MS |
|---------------|-------|----------------------------------|-------------|-------|----|-------|
| 0,2953 | 1,383 | No | Intergrupos | 181,7 | 3 | 60,58 |
| | | | Intragrupo | 525,5 | 12 | 43,79 |

Tabla 9: Prueba estadística ANOVA de una vía con $P < 0,05$, sobre los datos de porcentaje de HDL en animales sanos y animales experimentalmente infectados con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina®.

| Valor P | F | ¿Estadísticamente Significativo? | | SS | df | MS |
|---------------|--------|----------------------------------|-------------|-------|----|-------|
| 0,9185 | 0,1640 | No | Intergrupos | 20,80 | 3 | 6,933 |
| | | | Intragrupo | 507,2 | 12 | 42,27 |

Tabla 10: Prueba estadística ANOVA de una vía con $P < 0,05$, sobre los datos de porcentaje de LDL en animales sanos y animales experimentalmente infectados con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina®.

| Valor P | F | ¿Estadísticamente Significativo? | SS | df | MS | |
|---------|--------|----------------------------------|-------------|-------|----|-------|
| 0,8818 | 0,2184 | No | Intergrupos | 30,47 | 3 | 10,16 |
| | | | Intragrupo | 558,1 | 12 | 46,51 |

Tabla 11: Prueba estadística ANOVA de dos vías con $P < 0,05$ sobre los datos de concentración de colesterol en parásitos purificados de sangre de animales infectados experimentalmente con *Trypanosoma evansi* tratados y no tratados con Simvastatina®.

| Fuente de Variación | Valor P | F | ¿Estadísticamente Significativo? | Variación total (%) | SS | df | MS |
|---------------------|---------|-------|----------------------------------|---------------------|--------|----|---------|
| Tratamiento | 0,0060 | 10,36 | Si | 46,86 | 0,0023 | 2 | 0,00116 |
| Tiempo | 0,0259 | 11,95 | Si | 16,75 | 0,0008 | 1 | 0,00083 |

Apéndice 2. Parasitemia medida mediante el conteo por cámara de Neubauer.

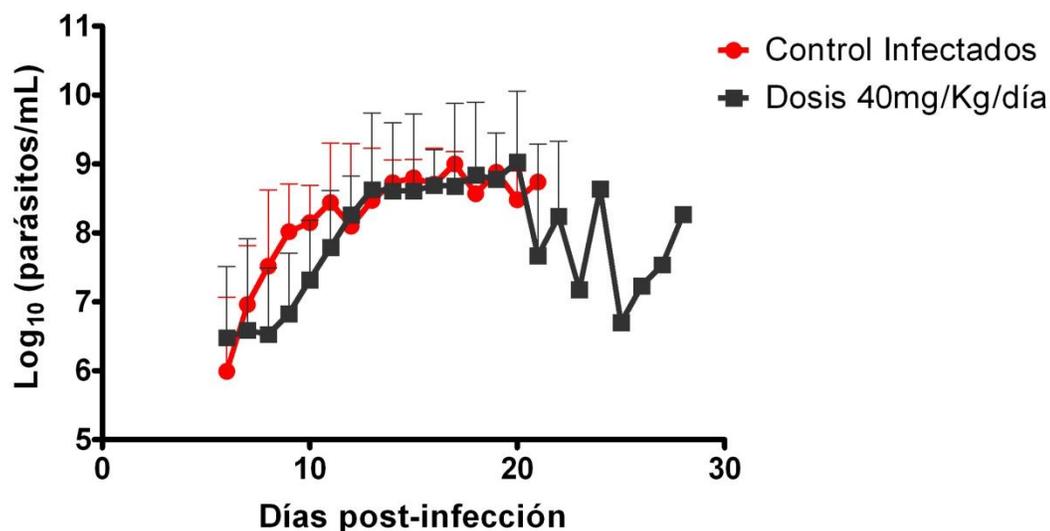


Figura 20: Parasitemia promedio mediante el conteo por cámara de Neubauer. En esta figura se aprecia la parasitemia de los animales experimentales de cada grupo con su respectiva desviación estándar (control infectados en rojo y dosis de 40mg/Kg/día en negro) determinada diariamente una vez realizada la infección e iniciado el tratamiento con Simvastatina®. Se trabajó con una muestra de 20 animales por grupo (n=20).