

Efectos deletereos del JC25 sobre la bioenergética celular y la biosíntesis de esteroides de *Leishmania braziliensis*

Deleterious effects of JC25 on cellular bioenergetics and sterol biosynthesis of *Leishmania braziliensis*

JORGE NÚÑEZ-DURÁN¹, DAZNIA BOMPART¹, JAIME CHARRIS², JOSÉ CAMACHO², DANIEL RODRÍGUEZ³, TANIA RODRÍGUEZ³, GONZALO VISBAL⁴, ÁLVARO ÁLVAREZ⁴, Yael GARCÍA-MARCHAN¹ y XENÓN SERRANO-MARTÍN^{1*}

Resumen

La Leishmaniasis es considerada por la OMS como una de las seis parasitosis con mayores índices de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Las drogas de primera línea utilizadas (Glucantime® y Pentostan®) generan graves efectos secundarios, así como fenómenos de quimioresistencia. En este sentido, nuestro grupo de investigación se planteó el reto de desarrollar y sintetizar nuevos compuestos antiparasitarios efectivos. Bajo metodologías de síntesis rápidas y económicas, logramos obtener 14 compuestos derivados de Benzimidazoles. Con la finalidad de evaluar el potencial antiparasitario, se realizaron curvas de crecimiento evaluando diversas concentraciones de los compuestos. Demostramos que uno de los derivados (JC25), disminuyó la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis* de manera dependiente de la dosis, con un valor de IC₅₀: 56µM. A través del uso de indicadores fluorescentes, determinamos que este compuesto desestabiliza el potencial electrogénico mitocondrial y genera alcalinización de los acidocalcisomas en estos parásitos. Adicionalmente y a través de estudios de GC/MS, determinamos que el JC25 interfiere con la biosíntesis de esteroides de estos parásitos, afectando la actividad de la enzima escualeno epoxidasa. Estos eventos explicarían en parte, el efecto leishmanicida observado. Finalmente, el JC25 generó un potente efecto sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* (IC₅₀: 12,78µM), sin afectar la viabilidad de las células hospederas. Teniendo en cuenta que el amastigote intracelular es el estadio terapéuticamente importante de la Leishmaniasis, el efecto mencionado anteriormente resulta muy interesante y permite realizar estudios más avanzados con este compuesto, o algunos otros con estructuras similares.

Palabras claves: Quimioterapia, *Leishmania braziliensis*, benzimidazol, bioenergética celular, esteroides.

Abstract

Leishmaniasis is considered by the World Health Organization (WHO) as one of the six parasitosis, with higher rates of morbidity and mortality worldwide. The first-line drugs (Glucantime® and Pentostan®) generate serious side effects in treated patients, and chemoresistance phenomena. Thus, our research group is committed to develop and synthesize new safe, economic and effective anti-parasitic compounds. By the use of rapid and economic synthesis methodologies, we developed 14 Benzimidazole-derived compounds. In order to evaluate the anti-parasitic potential, growth curves vs increasing compounds concentrations were done. We demonstrated that one of these compounds (JC25), affect the viability of *L. braziliensis* promastigotes in a dose-dependent manner, with an IC₅₀ value of 56µM. Using fluorescent indicators, we determined that this compound destabilizes the mitochondrial electrogenic potential and generate the alkalization of the parasites acidocalcisomes. Additionally and through GC/MS, we determined that JC25 interferes with the parasites sterols biosynthesis, affecting the activity of the enzyme squalene epoxidase. These results could explain the leishmanicide effect observed. Finally, JC25 yielded a potent effect on the viability of *L. braziliensis* intracellular amastigotes (IC₅₀: 12,78µM), without affecting the viability of the host cells. Given that intracellular amastigote is the therapeutically target of Leishmaniasis, the promising effect mentioned above pursue us to continue with further studies with this compound, or some other with similar structures.

key words: Chemotherapy; *Leishmania braziliensis*, benzimidazole, cellular bioenergetics, sterols.

¹ Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos. Área de Salud. Instituto de Estudios Avanzados IDEA. Caracas-Venezuela.

² Laboratorio de Síntesis Orgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela UCV. Caracas-Venezuela.

³ Laboratorio de Pesquisa Selectiva. Área de Salud. Instituto de Estudios Avanzados IDEA. Caracas-Venezuela.

⁴ Laboratorio de Síntesis Orgánica y Productos Naturales. Centro de Química. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC. Caracas-Venezuela.

* Correspondencia: Dr. Xenón Serrano-Martín. Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos. Área de Salud. Instituto de Estudios Avanzados IDEA. Carretera Nacional Hoyo de la Puerta. Valle de Sartenejas. Baruta. Caracas, República Bolivariana de Venezuela. Teléfono: +58 212 9035095; e-mail: xserrano@idea.gob.ve; xenonserrano@gmail.com

Introducción

Los parásitos protozoarios generan serias infecciones humanas, tales como: Leishmaniasis, Malaria, Tripanosomiasis africana y americana, entre otras. Estas parasitosis, se presentan mayoritariamente en países tropicales y en vías de desarrollo, impactando a un estimado del 40% de la población mundial (Monzote y Siddiq, 2011).

En Venezuela, Garrido y col. (2002) reportaron que la leishmaniasis es endémica y se encuentra distribuida en todos los estados del país. Desde 1955 al 2002 se reportaron cerca de 50.000 casos de leishmaniasis cutánea y más de 2.000 casos de leishmaniasis visceral. La enfermedad es predominante en alturas entre 0-1.800 metros sobre el nivel del mar. Los vectores más frecuentes para la leishmaniasis cutánea son *Lutzomyia ovallesi*, *Lutzomyia gomezi* y *Lutzomyia panamensis* mientras que los agentes causales son *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana*, siendo los principales reservorios varias especies de ratones salvajes. Tanto *Leishmania chagasi* como *Leishmania infantum* han sido identificados como agentes causales de leishmaniasis visceral, utilizando como vector *Lutzomyia longipalpis* y *Lutzomyia evansi*, y a los perros como principal reservorio.

En el bienio 2008-2009, un total de 4.640 casos de las diferentes formas clínicas de leishmaniasis cutánea fueron diagnosticados en Venezuela, con una media de 2.320 casos por año, y una tasa promedio anual de 8,25 por cada 100.000 habitantes. Predomina el sexo masculino con una razón de masculinidad de 1,84 para el período en estudio. Se registraron casos en todas las edades, con predominio numérico en el grupo de 5 a 34 años y una edad promedio de 31,09 y 33,91 años para los años 2008 y 2009 respectivamente. En cuanto a la ocupación 22,39% corresponde a personas del sector agropecuario, seguido de estudiantes con 20,88% de los casos. Se registraron casos en todas las entidades federales del país, menos en Nueva Esparta. En este período los estados con mayor número de casos fueron Lara con 910 (19,61%), Miranda con 650 (14,01%) y Táchira con 488 (10,52%). En cuanto a las formas clínicas se observó un predominio franco de la leishmaniasis cutánea localizada con 97,84% de los casos, generada por *Leishmania braziliensis*. (De Lima y col., 2011)

El avance en el campo de las vacunas contra la Leishmaniasis, se torna cada vez más lento y arduo. Por esta razón, la quimioterapia representa el elemento crucial en cualquier política de control de esta enfermedad. En tal sentido, las drogas más utilizadas en Latino América para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea son el antimonio de meglumina (Glucan-

time®) y el estibogluconato de sodio (Pentostan®). Sin embargo, se reportan recidivas en porcentajes elevados, severos efectos tóxicos a nivel cardíaco, renal y hepático, así como importantes fenómenos de quimioresistencia. La vía de administración de las sales antimoniales pentavalentes debe ser parenteral: intramuscular o intravenosa, lo cual también complica el tratamiento, dada la necesidad de dirigirse a un centro asistencial especializado para su aplicación (Bonfante y Barroeta, 2002). El uso indiscriminado de estos fármacos para el tratamiento de leishmaniasis visceral, ha generado importantes fenómenos de resistencia parasitaria en el Sur de Europa, Irán, Sur-América y noroeste de India (Fasel y Myler, 2008), limitando su uso en estas regiones.

Basados en estas razones, nuestro grupo de investigación ha venido estudiando alternativas terapéuticas que sirvan de base para el desarrollo de nuevas terapias seguras, económicas y efectivas contra la Leishmaniasis.

En este orden de ideas, resulta notable que la mayoría de los compuestos desarrollados por la industria farmacéutica contengan algún sistema heterocíclico en su estructura, demostrando su valioso aporte en la generación de actividad biológica. (Camacho y col., 2011). Con la finalidad de proporcionarle mayor actividad a este tipo de compuestos, se ha planteado la introducción de un grupo aromático que done y atraiga electrones en diversas posiciones de la molécula, así como diferentes sustituyentes con reconocido potencial biológico tales como: cloro, hidroxil, ariloxi y metoxi (Camacho y col., 2011).

Se ha demostrado que derivados de benzimidazoles tricíclicos presentan actividad antimalárica (Barazarte y col., 2008). Este estudio, muestra que la presencia de un grupo metil sustituyente en el anillo aromático es favorable para la actividad antimalárica. Se demostró además, que la mayoría de los compuestos que contenían este grupo generaban una importante inhibición de la degradación de la hemoglobina, independientemente de la naturaleza de la sustitución en el anillo aromático (Barazarte y col., 2008). Estos detalles estructurales, resultan interesantes en términos de evaluar el efecto de derivados de benzimidazoles, sobre la viabilidad de otros organismos relacionados, como por ejemplo, parásitos tripanosomatídeos.

Por esta razón, nos interesamos en el proceso de síntesis de compuestos pertenecientes a esta familia de Benzimidazoles, los cuales se caracterizan por poseer un sistema bicíclico con un anillo de benceno fusionado a otro con dos heteroátomos (nitrógeno o azufre). Las ventajas de orientarnos por este tipo de síntesis respecto a otras descritas en la literatura, son

su simplicidad, los rendimientos elevados y su versatilidad, ya que la posición R1 (fig. 1), es sustituible por un átomo de hidrógeno, un fenil o un naftil y siendo el heteroátomo sobre el anillo de cinco miembros un oxígeno o un azufre (Camacho y col., 2011).

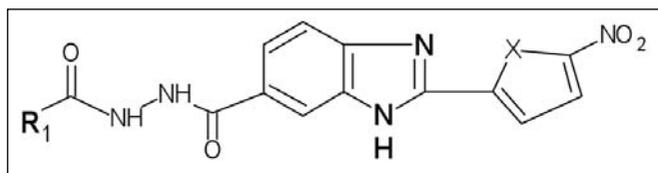


Figura 1: Estructura química general de los Benzimidazoles (Camacho y col., 2011).

Tomando en cuenta todos estos antecedentes, nuestro grupo de investigación desarrolló y sintetizó 14 derivados de benzimidazoles, los cuales fueron evaluados como leishmanicidas en cultivos de *Leishmania braziliensis*. Resaltante fue el hecho que el derivado JC25 (fig. 2) afectó la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, de una manera dependiente de la dosis. Del mismo modo, demostramos que este compuesto afecta la bioenergética celular (funcionamiento de la mitocondria y acidocalcisomas), así como la biosíntesis de esteroides libres en esta especie de parásitos.

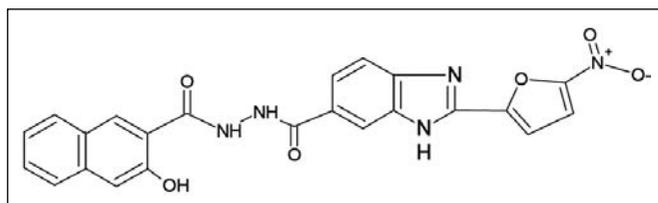


Figura 2: Estructura química del derivado de Benzimidazol JC25 (Camacho y col., 2011).

Materiales y métodos

REACTIVOS, FLUORÓFOROS Y DEMÁS QUÍMICOS.

Todas las soluciones se prepararon con reactivos adquiridos en las casas comerciales SIGMA, Promega, Invitrogen, Gibco B.R.L. y BIO-RAD. Rodamina 123 (Molecular Probes; Eugene, OR), Naranja de Acridina (Molecular Probes; Eugene, OR) FCCP y Nigericina (Sigma; St. Louis, MO). El derivado JC25 fue sintetizado según procedimiento reportado por (Camacho y col., 2011).

CULTIVOS CELULARES

Promastigotes de *Leishmania (V.) braziliensis* cepa MHOM/CO/87/UA301 (amablemente cedida por el Dr. Carlos Muskus. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET Universidad de

Antioquia, Colombia), fueron cultivados en medio LIT (Liver Infusion Tryptose: triptosa 15 g/L, extracto de levadura 5 g/L, extracto de hígado 2 g/L, $C_6H_{12}O_6$ 4 g/L, NaCl 9 g/L, KCl 0,4 g/L y Na_2HPO_4 7,5 g/L), suplementado con Hemina (20 mg/L), suero fetal bovino (SFB) inactivado (10%) y antibiótico amikacina (0,1 mg/mL), manteniéndose a 29°C, en frascos de cultivo de 25 mL.

Macrófagos BMDM (Bone Marrow derivated macrophage) fueron obtenidos de médula ósea de fémur de ratón Balb/C, según lo reportado por Marim y col., 2010, con modificaciones menores. Brevemente, el contenido de médula ósea extraído mecánicamente, fue cultivado en medio selectivo BMDM, compuesto por: DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) alto en glucosa, 20% de SFB y 30% de sobrenadante de células L-929 (fibroblasto de ratón). Este cultivo permaneció durante 7 días, a 37°C y 5% de CO_2 para su diferenciación.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE DERIVADOS DE BENZIMIDAZOL SOBRE PROMASTIGOTES DE *L. BRAZILIENSIS*.

La susceptibilidad de promastigotes de *L. braziliensis* a 14 derivados de Benzimidazol, fue evaluada mediante la preparación de curvas de crecimiento en ausencia y presencia de los compuestos, según lo reportado por Serrano-Martín y col., 2009a. Brevemente, un inóculo inicial de 1×10^6 promastigotes/mL, fueron colocados en medio LIT-hemina suplementado, en frascos de cultivo de 25 mL. Transcurridas 24 h, se agregaron las diversas concentraciones de cada compuesto disueltos en Dimetilsulfóxido (DMSO, 0.1% final). La proliferación celular se determinó mediante conteo directo con cámara de Neubauer, diariamente, durante 5 días consecutivos, hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo. Se incluyó un control del experimento al cual no se le agregó compuesto alguno, y otro al cual se le agregó 0.1% de DMSO. Se realizaron 3 experimentos independientes con cada concentración de compuesto, contándose así cada condición experimental por triplicado. Seguidamente y según lo reportado por Serrano-Martín y col., 2009a, se elaboró una curva dosis-respuesta graficando el número de parásitos contra concentraciones de compuesto tomando los datos de las 96 h de cultivo. A partir de esta curva, se determinó el valor de IC_{50} mediante el método de interpolación lineal propuesto por Huber y Koella (1993). Brevemente, este método propone tomar dos concentraciones (X_1 y X_2), de manera tal que la densidad de parásitos (Y_1) a la concentración de droga (X_1) (y todas las concentraciones inferiores), sea mayor que la mitad de la densidad encontrada en el control (Y_0). Del mismo modo, la densidad encontrada

para la concentración de droga X_2 (y todas las concentraciones superiores), sea menor que la mitad de la densidad (Y_0). El IC_{50} fue determinado por interpolación lineal entre las concentraciones (X_1 y X_2) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Log}(EC_{50}): \text{Log}(X_1) + \frac{\{(Y_1)-(Y_0/2)\}}{Y_1-Y_2} (\text{Log}(X_2)-\text{Log}(X_1))$$

Finalmente, fue seleccionado el derivado JC25 debido a su alta actividad sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*, aunado a sus buenas condiciones de solubilidad y estabilidad en el tiempo.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE JC25 SOBRE POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL DE *L. BRAZILIENSIS*

Las estimaciones del potencial de membrana mitocondrial se llevaron a cabo según lo reportado por Serrano-Martín y col. (2009a), con modificaciones menores. Para la realización de este ensayo, utilizamos el fluoróforo Rodamina 123 el cual presenta un pico máximo del espectro de excitación a 488 nm y un pico máximo en su espectro de emisión a 530 nm. Este fluoróforo tiene la capacidad de intercalarse entre las membranas externa e interna de la mitocondria de los parásitos, permitiendo monitorear las variaciones en el potencial electroquímico del organelo debido al efecto del compuesto evaluado. Brevemente, 1×10^8 promastigotes de *L. braziliensis* fueron cargados con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Rodamina 123, en buffer de carga (130 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM KH_2PO_4 , 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) incubándose por 30 min a 29°C y en agitación constante. Luego de la incubación, los promastigotes fueron expuestos a distintos efectores durante 5 min y lavados 2 veces con el buffer anterior. Finalmente, las distintas condiciones experimentales fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia ZEISS modelo observer Z1.

ESTUDIO DEL EFECTO DE JC25 SOBRE ALCALINIZACIÓN DE ACIDOCALCISOMAS DE *L. BRAZILIENSIS*

Para realizar estas mediciones se empleó el fluoróforo Naranja de Acridina (NA), el cual tiene la capacidad de acumularse en compartimientos ácidos tales como acidocalcisosomas, de acuerdo con el potencial de H^+ presente en los mismos. Inicialmente, promastigotes de *L. braziliensis* fueron cargados con 2 μM de Naranja de Acridina en buffer de carga (130 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM KH_2PO_4 , 20 mM Tris-HCl, pH 7.4), incubándose durante 5 min, a 29°C y agitación constante. Posteriormente, los promastigotes cargados se

incubaron con los efectores correspondientes por 5 min y fueron lavados 2 veces con buffer de carga. Finalmente, las distintas condiciones experimentales fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia ZEISS modelo observer Z1.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE JC25 SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE ESTEROLES LIBRES EN *L. BRAZILIENSIS*

El contenido de esteroides libres en promastigotes tratados y no tratados con JC25, fue determinado mediante cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masas de alta resolución, según lo reportado por Serrano-Martín y col., 2009a. Inicialmente, 50×10^6 promastigotes de *L. braziliensis* fueron cultivados en presencia de JC25, durante 5 días. Seguidamente, los lípidos totales fueron extraídos con una mezcla coloroformo:metanol (2:1). El extracto fue secado y luego resuspendido en un volumen mínimo de cloroformo. Esta suspensión fue corrida en una columna de ácido silícico (1.5 x 4 cm), luego lavada con 5 volúmenes de cloroformo con la finalidad de separar lípidos neutros (esteroides) de otras fracciones lipídicas. Finalmente, la muestra fue resuspendida en 5 μL de cloroformo. Para la cuantificación de esteroides libres y establecimiento de correspondencias estructurales, 1 μL de cada muestra fue inyectada en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A, acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución Agilent Technologies 5975C. Las condiciones del equipo fueron las siguientes: columna de capilaridad de alta resolución (25 m x 0.20 mm (diámetro interno); Ultra-2; 5% fenil-metil-siloxane; espesor de la película, 0.33 μm), temperatura inicial de inyección 50°C (1 min), seguido de un incremento de temperatura hasta 280°C (a una tasa de 25°C/min), y luego hasta 300°C (a una tasa de 1°C/min), utilizándose Helio como gas de flujo a una tasa constante de 0.6 mL/min.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE JC25 SOBRE LA VIABILIDAD DE AMASTIGOTES INTRACELULARES DE *L. BRAZILIENSIS*

Para realizar este ensayo, se preparó una mezcla de macrófagos BMDM-promastigotes de *L. braziliensis*, en una proporción 1:10 diluido en medio DMEM. Seguidamente, 200 μL de la mezcla fueron colocados en placas de 24 pozos, incubando en cámara húmeda, por 6 horas a 37°C y 5% de CO_2 con la finalidad de garantizar la interacción inicial entre promastigotes y macrófagos. Luego, se agregó a cada condición las concentraciones correspondientes de JC25 a evaluar, incubando nuevamente por 96 horas, a 37°C y 5% de CO_2 . Transcurrido este tiempo, cada condición fue fijada y teñida con Giemsa. El efecto del JC25 sobre la

viabilidad de amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, se determinó contabilizando: número de amastigotes por macrófago, número de macrófagos infectados y total de macrófagos. Se realizaron 3 experimentos independientes de cada concentración del compuesto, contándose cada condición por triplicado. Realizado lo anterior, se determinó el porcentaje de células infectadas respecto al control del experimento sin droga (100% de infección) según lo reportado por Brito y col. (2006), con modificaciones menores. Con estos datos, se procedió a elaborar una curva que expresa el porcentaje de infección de los macrófagos, respecto a las concentraciones crecientes de JC25. Finalmente fue calculado el valor de IC_{50} correspondiente según lo descrito en secciones anteriores y de acuerdo a lo reportado por Serrano-Martín y col., 2009a.

Resultados

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE JC25 SOBRE PROMASTIGOTES DE *L. BRAZILIENSIS*

Poblaciones de promastigotes de *L. braziliensis* fueron expuestas a diversas concentraciones de JC25, determinando su viabilidad, durante 5 días consecutivos. La figura 3 muestra el efecto inhibitorio dependiente de la dosis, del JC25 sobre la viabilidad parasitaria. Es posible apreciar un efecto sobre la proliferación celular, 24 h posteriores a la adición del JC25. Mediante la realización de una curva dosis-respuesta, fue posible calcular la concentración de JC25 capaz de inhibir la viabilidad del 50% de los promastigotes en cultivo (IC_{50}): $56\mu M$. Este resultado demuestra la capacidad que tiene el JC25 de afectar moderadamente la viabilidad de esta especie de parásitos, al menos, en su estadio extracelular.

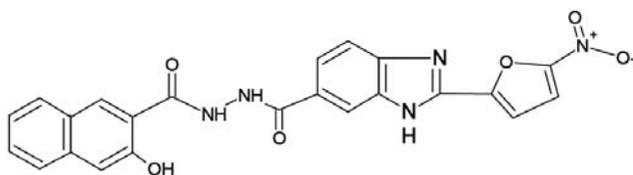


Figura 3. Efecto de JC25 sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*. Curva de crecimiento de promastigotes de *L. braziliensis* expuestos a concentraciones crecientes de JC25. Cada condición fue contada en cámara de Neubauer diariamente y por triplicado, por motivos estadísticos. $IC_{50,56}$ ($\pm 3\mu M$).

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE JC25 SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL DE *L. BRAZILIENSIS*

Como explicamos anteriormente, la rodamina 123 es un fluoróforo sensor del potencial electrogénico presente en el mitocondrion de estos parásitos. En es-

te sentido la figura 4 (panel izquierdo, correspondiente al control), muestra promastigotes cargados con este fluoróforo observándose una intensa acumulación en compartimientos citoplasmáticos alargados, correspondientes al mitocondrion (flechas). Al evaluar el efecto del JC25 (panel central), observamos la disipación de la fluorescencia acumulada en estos organelos, similar a la producida por el desacoplante clásico FCCP (panel derecho). Teniendo en cuenta que el protonóforo clásico FCCP, es capaz de disipar el potencial electrogénico mitocondrial, podría sugerirse que el JC25 provoca un efecto similar sobre la mitocondria de *L. braziliensis*. Sin embargo, es necesario realizar estudios cuantitativos para corroborar una alteración del potencial electrogénico mitocondrial, inducida por JC25.

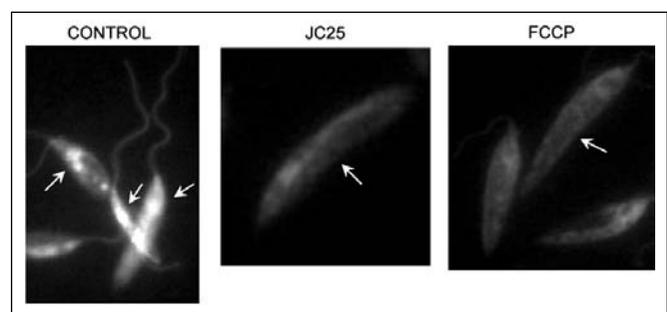


Figura 4. Efecto de JC25 sobre el potencial electrogénico mitocondrial de *L. braziliensis*. Parásitos incubados en presencia de Rodamina 123 por 45 min. CONTROL (parásitos cargados, sin compuesto), JC25 (parásitos cargados + JC25, $56\mu M$), FCCP (parásitos cargados + FCCP, $2\mu M$).

*Estudio del efecto del JC25 sobre la alcalinización de acidocalcisosmas de *L. braziliensis*:* En la figura 5 se muestran promastigotes cargados con naranja de acridina, marcador clásico de acidocalcisosmas para estos parásitos. En el panel izquierdo (correspondiente al control), se puede observar la acumulación del fluoróforo en compartimientos citoplasmáticos redondeados, correspondientes a los acidocalcisosmas (flechas). Al evaluar el efecto del JC25 (panel central), observamos la disipación de la fluorescencia acumulada en estos organelos, similar a la producida por el intercambiador clásico nigericina (panel derecho). El hecho que el JC25 genere un efecto similar al intercambiador H^+K^+ electrón-neutro nigericina (conocido por su capacidad de alcalinizar completamente acidocalcisosmas), sugiere que este compuesto podría estar alterando los niveles de acidez de estos organelos en *L. braziliensis*. Sin embargo, es necesario realizar estudios cuantitativos para corroborar una alcalinización de los acidocalcisosmas producto del JC25.

*Determinación del efecto de JC25 sobre la biosíntesis de esteroides libres en *L. braziliensis*:* lípi-

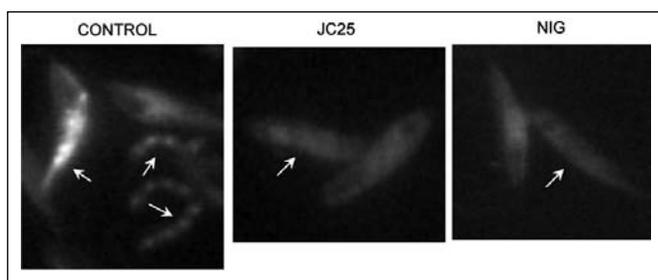


Figura 5. Efecto de JC25 sobre la alcalinización de acidocalcisomas de *L. braziliensis*. Parásitos incubados en presencia de Naranja de Acridina por 5 min. CONTROL (parásitos cargados, sin compuesto), JC25 (parásitos cargados + JC25, 56 μ M), Nigericina (parásitos cargados + Nig, 2 μ M).

dos neutros de promastigotes de *L. braziliensis* tratados y no tratados con JC25 fueron extraídos e inyectados en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución. Se puede observar en la Tabla I, que los parásitos no tratados contienen 63,7% de 5-dehidroepisterol y 22,7% del intermediario escualeno, consecuente con lo reportado en la literatura (Rodrigues, 2002). Por otra parte, parásitos tratados con el IC_{50} de JC25 (56 μ M), muestran una drástica disminución en los niveles de 5-dehidroepisterol (16,2%), producto de una importante acumulación del intermediario escualeno (73,2%). La prueba de "t" en presencia de homogeneidad de las varianzas, muestra que existen diferencias significativas entre el tratamiento con JC25 y el control para todas las variables ($p \leq 0,05$). Este resultado sugiere de manera indirecta, que el JC25 es capaz de afectar la actividad de la enzima escualeno epoxidasa, encargada de la inter-conversión de escualeno a epóxido de

escualeno. Este paso, resulta esencial para el desarrollo de la ruta biosintética en cuestión, la cual es fundamental para la sobrevivencia de *L. braziliensis*.

Evaluación del efecto de JC25 sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* Macrófagos BMDM fueron infectados con promastigotes de *L. braziliensis* con la finalidad de evaluar el efecto del JC25 sobre el porcentaje de infección, y la viabilidad de amastigotes intracelulares de esta especie de parásitos. En la figura 6, es posible observar como disminuye drásticamente el número de macrófagos infectados y el número de amastigotes por macrófago, a medida que se incrementa la concentración de

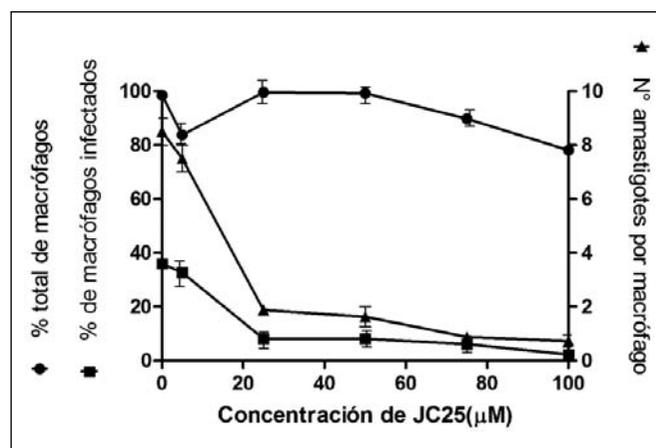


Figura 6. Efecto de JC25 sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*. Macrófagos BMDM infectados con amastigotes de *L. braziliensis* en una proporción 1:10. Porcentaje de macrófagos infectados (■), N° de amastigotes por macrófago (▲) y porcentaje total de macrófagos (●) determinados a las 96 h post-tratamiento. IC_{50} : 12,78 μ M (\pm 1 μ M), determinado sobre el N° de amastigotes por macrófago.

Tabla I

Evaluación del efecto de JC25 sobre la biosíntesis de esteroides de *L. braziliensis*

Esteroides	Tiempo de retención (min)	% de masa luego del tratamiento con:		p-valor
		Control	JC25 (56 μ M)	
Colesterol exógeno	24,2	13,6 \pm 0,38	10,6 \pm 1,01	0,0470
14-methyl Endógeno Escualeno	20,5	22,7 \pm 0,69	73,2 \pm 1,05	<0,0001
14-desmethyl Endógeno Ergosta-5,7,24(241)-trien-3 β -ol (5-dehidroepisterol)	28,9	63,7 \pm 2,00	16,2 \pm 0,44	<0,0001

Porcentajes de masa del intermediario escualeno y 5-dehidroepisterol en esta ruta biosintética. Promastigotes control y expuestos a JC25, 56 μ M. Parámetros determinados mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrometría de masas de alta resolución. Se realizó la prueba "t" para los análisis estadísticos utilizando InfoStat versión 2012 (Di Rienzo y col., 2012), arrojando diferencias significativas entre el tratamiento con JC25 y el control ($p \leq 0,05$).

JC25, sin afectar la viabilidad de las células hospederas. Es importante resaltar que este efecto específico para los amastigotes es dependiente de la dosis, mostrando un valor de IC_{50} : 12,78 μ M, el cual es 4,38 veces menor al IC_{50} determinado en este estudio para promastigotes (56 μ M).

Discusión

A pesar de los esfuerzos realizados durante más de 60 años en el campo de la quimioterapia contra la leishmaniasis, actualmente solo ha surgido una droga alternativa para su tratamiento, la Miltefosina[®]. Este alquil-lisofosfolípido activo por vía oral es el mayor avance en la batalla contra esta parasitosis, sin embargo su baja ventana terapéutica, teratogenicidad y desarrollo de resistencia ha limitado ampliamente su uso en regiones endémicas (Serrano-Martín, 2010). En este sentido, nuestros estudios se abocan al desarrollo de compuestos alternativos, seguros y económicos que representen una alternativa viable contra la leishmaniasis. En el presente trabajo evaluamos el efecto de 14 derivados de benzimidazol sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*. Estudiamos además, posibles mecanismos de acción de estos compuestos sobre los parásitos, que explicaran el efecto antiparasitario observado. Determinamos entonces que el compuesto JC25, generó un moderado efecto dependiente de la dosis sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*, mostrando un valor de IC_{50} de 56 μ M. Teniendo en cuenta, que en la literatura no existen reportes del efecto de derivados de benzimidazoles sobre la viabilidad de *L. braziliensis*, valores similares de actividad parasiticida fueron reportados por Serrano-Martín y col., (2006) y Orué y col., (2007). Ambos demostraron que el fármaco de uso humano Glibenclamida[®] afectaba la viabilidad de promastigotes de *L. mexicana* con un IC_{50} : 54 μ M. Esta evidencia, valida al JC25 como un compuesto de acción moderada sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*, sujeto a ser evaluado en siguientes fases de estudio.

Con la finalidad de determinar los posibles mecanismos de acción mediante los cuales el JC25 afecta la viabilidad de *L. braziliensis*, exploramos su efecto sobre la bioenergética celular y la biosíntesis de esteroides. Inicialmente demostramos que el JC25 afectaba el normal funcionamiento de la mitocondria y los acidocalcisomas. En este sentido, el compuesto fue capaz de simular el efecto del protonóforo clásico FCCP, induciendo la liberación de rodamina 123 desde la membrana interna de la mitocondria. Este comportamiento fue observado anteriormente con compuestos aromáticos como la aminoquinolina pentamidina, la

cual genera una pérdida del potencial mitocondrial en *L. donovani* (Vercesi y Docampo, 1992).

Los resultados muestran una pérdida en la acumulación de la naranja de acrinida en acidocalcisomas de promastigotes tratados con JC25. Esta disipación de la fluorescencia, fue similar a la generada por el intercambiador H^+/K^+ electroneutro nigericina, el cual es conocido por su capacidad de alcalinizar los acidocalcisomas de estos parásitos (Vercesi y col. 2000). La perturbación del normal funcionamiento de los acidocalcisomas, ha sido asociada al efecto citotóxico de algunos compuestos sobre la viabilidad de estos parásitos (Serrano-Martín y col. 2009a, Vercesi y col. 2000).

Tanto la mitocondria como los acidocalcisomas, son organelos fundamentales en el aporte energético y fisiológico que sustenta la viabilidad de estos parásitos (Docampo, 2001). El efecto del JC25 sobre estos organelos, pudiese justificar en principio la acción de este compuesto sobre la viabilidad de *L. braziliensis*. Sin embargo, resulta necesario realizar evaluaciones cuantitativas, para determinar el mecanismo de acción específico mediante el cual el JC25 afecta el funcionamiento de mitocondrias y acidocalcisomas de *L. braziliensis*. Sería interesante evaluar por ejemplo, el efecto del compuesto sobre los mecanismos de transporte de acidocalcisomas aislados, así como sobre las enzimas asociadas a la cadena transportadora mitocondrial.

En términos de seguir sustentando el efecto del JC25 sobre la viabilidad de *L. braziliensis*, indagamos otros posibles mecanismos de acción los cuales en conjunto, nos permitan explicar la acción leishmaniciada observada.

En este sentido, estudiamos la ruta de síntesis de esteroides de promastigotes expuestos a JC25, encontrando importantes alteraciones en el perfil de esteroides determinado. Estas, sugieren un efecto sobre la enzima escualeno epoxidasa, esencial en la ruta de síntesis de 5-dehidroepisterol en *Leishmania* spp (fig. 7). En la población control los niveles de 5-dehidroepisterol (63,7%), y escualeno (22,7%), fueron similares a los reportados anteriormente para este género de parásitos (Rodríguez y col., 2002). Sin embargo, los promastigotes expuestos a JC25 mostraron una significativa disminución en los niveles de 5-dehidroepisterol (16,2%), así como una acumulación del intermediario escualeno (73,2%). Lo anterior constituye una evidencia indirecta de que JC25 afectó la actividad de la enzima escualeno epoxidasa esencial en la ruta de síntesis de 5-dehidroepisterol en *Leishmania* spp (fig. 7). Actualmente en la bibliografía, no existe ningún reporte referente al efecto de derivados de benzimidazoles sobre la ruta de biosíntesis de esteroides en *Leishmania* spp. Sin embargo, recientemente se determinó que la

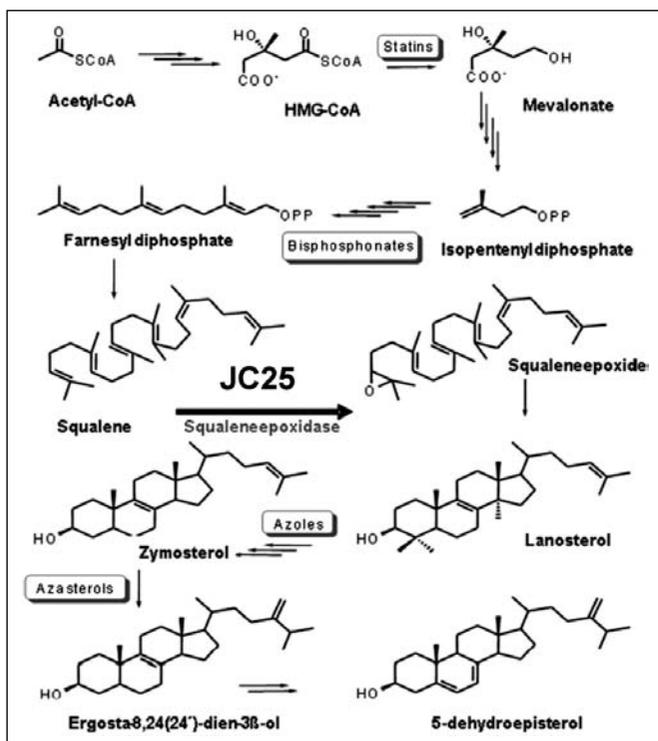


Figura 7. Fragmento de la ruta de síntesis de esteroides en *Leishmania* spp. (Serrano-Martín y col., 2009a).

afectación de la actividad de esta enzima en *L. mexicana*, se traduce en un potente efecto sobre la viabilidad de estos tripanosomatídeos (Serrano-Martín y col., 2009a).

Considerando que la enzima escualeno epoxidasa es esencial en la ruta de biosíntesis de 5-dehidroepisterol de *Leishmania* spp. (Urbina y Docampo, 2003), la capacidad del JC25 para afectar la actividad de esta enzima podría contribuir a su efecto inhibitorio sobre la viabilidad de *Leishmania braziliensis*. Sin embargo, deben realizarse mediciones de actividad enzimática de la escualeno epoxidasa, para confirmar este supuesto.

Resulta interesante el hecho que el JC25 comprometiera notablemente la viabilidad de amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, el cual es el estadio clínicamente importante de la Leishmaniasis. Los resultados muestran que el JC25 fue 4,38 veces más potente sobre este estadio (IC_{50} : 12,78 μ M) que sobre promastigotes libres (IC_{50} : 56 μ M), sin afectar además la viabilidad de su célula hospedera (macrófagos BMDM).

Este representa el primer reporte referente al efecto leishmanicida de un derivado de benzimidazol sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *Leishmania* spp, lo cual proyecta la posibilidad de evaluar este tipo de derivados, a otros niveles de estudio como por ejemplo animales infectados (estudios *in vivo*).

Agradecimientos

Los autores de este trabajo agradecemos a los Drs. José Álvarez, Gustavo Benaim y Katherine Figarella por el material y soporte técnico amablemente prestado. A los Drs. Leandro Balzano y Jhonny Demey por su colaboración con los análisis estadísticos.

Referencias bibliográficas

- Barazarte A, Camacho J, Domínguez J, Lobo G, Gamboa N, Rodrigues J, Capparelli MV, Álvarez-Larena A, Andujar S, Enriz D, Charris J. 2008. Synthesis, antimalarial activity, structure-activity relationship analysis of thieno-(3,2-b)benzothiazine S,S-dioxide analogs. *Bioorg Med Chem*. 16(7): 3661-74.
- Bofante R, Barroeta S. 2002. Leishmaniasis y Leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. Tipografía y Litografía Horizonte C.A. Barquisimeto, Venezuela. (1): 26-38.
- Brito S, Crescente O, Fernández A, Coronado A, Rodríguez N. 2006. Eficacia del ácido kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asteraceae) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Biomédica* 26: 180-87.
- Camacho J, Barazarte A, Gamboa N, Rodríguez J, Rojas R, Vaisberg A, Gilman R, Charris J. 2011. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole-5-carbohydrazide derivatives as antimalarial, cytotoxic and antitubercular agents. *Bioorg Med Chem* 19: 2023-29.
- De Lima H, Borges R, Escobar J, Convit J. 2011. Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela, bienio 2008-2009. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. Vol. LI (2): 215-224.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG., González L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2012 (URL <http://www.infostat.com.ar>). Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Docampo R, Moreno SNJ. 2001. The acidocalcisome. *Mol Biochem Parasitol* 33: 151-159
- Fasel N, Myler P. 2008. *Leishmania: After the Genome*. Horizon Scientific Press. Edición Ilustrada. Norfolk, UK. 1: 50-55
- Garrido RB, Bonfante-Garrido R. 2002. Leishmaniasis in Venezuela. *J Paras Dis* 20: 69-73.
- Huber W, Koella J. 1993. A comparison of three methods of estimating EC_{50} in studies of drug resistance in malaria parasites. *Acta Trop*. 55: 257-61.
- Marim F, Silveira T, Lima D, Zamboni D. 2010. A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. *PLoS One* 5(12): 15263-68.
- Monzote L, Siddiq A. 2011. Drug development to protozoan diseases. *Med Chem J* 5:1-3.
- Orué A, Pérez JL, Fuentes J, Odreman I, Serrano-Martín X, Mendoza-León A. 2008. *Leishmania* sp.: efecto de la glibenclamida, un bloqueador de canales K^{+}_{ATP} , sobre el ciclo de vida *in vitro*. *Salus* 11(1): 32-36.

- Rodrigues CF, Attias M, Rodríguez C, Urbina JA, de Souza W. 2002. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a 24(25)-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 487–499.
- Serrano-Martín X, Payares G, Mendoza-León A. 2006. Glibenclamide, a blocker of K^+_{ATP} channels shows anti-leishmanial activity in experimental murine cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother* 4: 72-76.
- Serrano-Martín X, García-Marchan Y, Fernández A, Rodríguez N, Rojas H, Visbal G, Benaim G. 2009. Amiodarone destabilizes the intracellular Ca^{2+} homeostasis and the biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob. Agents Chemother* 53:1403-1410.
- Serrano-Martín, X. 2010. Quimioterapia contra la Leishmaniasis: estado del arte, retos y nuevas propuestas desde Venezuela. *Revista de Estudios Transdisciplinarios (RET)* 2(1): 69-76
- Vercesi AE, Docampo R. 1992. Ca^{2+} transport digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca^{2+} , pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *Biochem J* 284:463-7.
- Vercesi, AE, Rodrigues CO, Catisti R, Docampo R. 2000. Presence of a Na^{+}/H^{+} exchanger in acidoclastosomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. *FEBS Lett.*, 473: 203-6.
- Urbina JA, Docampo R. 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 19: 495-501.