

### III. Diseño, síntesis y estudio de un compuesto con posible actividad tripanosomicida

Charmina Aguirre-Alvarado,<sup>a</sup> Fabiola Zaragoza-Martínez,<sup>b</sup> Lorena Rodríguez-Páez,<sup>a</sup> Benjamín Noguera-Torres,<sup>b</sup> Isabel Baeza-Ramírez<sup>a</sup> y Carlos Wong-Ramírez<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamentos de Bioquímica y <sup>b</sup> Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, INP, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 20 de abril de 2006

Aceptado: 23 de junio de 2006

#### RESUMEN

*En el simposio sobre "Desarrollo de nuevos fármacos en México", hicimos un resumen de los trabajos que nos han permitido desarrollar compuestos con posible actividad tripanosomicida. Se describió el estado actual de la enfermedad de Chagas y la ineficiencia de los fármacos empleados para su tratamiento.*

*La estrategia que se siguió para desarrollar un compuesto con actividad tripanosomicida fue la siguiente: se utilizó como enzima blanco la  $\alpha$ -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II de *T. cruzi* para tratar de inhibir el metabolismo energético de este parásito. Se diseñó y sintetizó el compuesto y se determinó su actividad biológica; el ácido *N*-isopropil oxámico resultó ser un inhibidor selectivo de esta enzima y presentó, además, actividad tripanosomicida en cultivos de epimastigotes, tripomastigotes circulantes y amastigotes en tejido. Los estudios preliminares muestran el efecto tripanosomicida del éster etílico del *N*-isopropil oxámico sobre los amastigotes intracelulares. Este compuesto reduce en un 60 a 80% el número de nidos de amastigotes en músculos cardíaco y esquelético, mientras que el nifurtimox, uno de los fármacos empleado actualmente para el tratamiento de esta enfermedad, produce una disminución de 20 a 30%, lo cual concuerda con lo que se informa en relación con el poco efecto de este fármaco en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.*

#### Palabras clave:

*Enfermedad de Chagas, fármacos tripanosomicidas*

#### SUMMARY

*During the symposium "Design of new drugs in Mexico", we presented a summary of the research that led us to develop substances with trypanocidal activity. The epidemiological pattern of Chagas' disease was briefly described as well as the factor that explains the low cure rate seen among chagasic patients.*

*The strategy used to develop a new compound with trypanocidal activity was the following: we used *T. cruzi*  $\alpha$ -hydroxiacid dehydrogenase isoenzyme II, as a target enzyme, trying to inhibit the energetic metabolism of this parasite. *N*-isopropyl oxamic acid the substance we designed was synthesized and its biological activity was determined. It is a selective inhibitor of this enzyme and in addition, showed trypanocidal activity on cultured epimastigotes, circulating trypomastigotes and intracellular amastigotes. Preliminary studies show the trypanocidal effect of the ethyl ester of *N*-isopropyl oxamic acid on intracellular amastigotes. This compound reduced by 60-80% the number of amastigotes nests on both cardiac and skeletal muscle, whereas Nifurtimox, the currently drug used for treatment of this disease, produced a reduction on amastigotes nests of 20-30%, in agreement with previous reports describing the low trypanocidal effect of this compound, in chronic stages of Chagas' disease*

#### Keywords:

*Chagas' disease, trypanocidal drugs*

#### Introducción

La enfermedad de Chagas, llamada así después de que el médico brasileño Carlos Chagas la describió en 1909, existe sólo en el continente americano, desde México hasta el sur de Argentina. Afecta entre 16 y 18 millones de personas; 20,000 de ellas mueren anualmente y alrededor de 100 millones más (25% de la población de América latina) están en riesgo de adquirir esta enfermedad; dicho riesgo está en relación directa con la pobreza.<sup>1,2</sup>

La enfermedad de Chagas es causada por el *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), un parásito protozoario flagelado que es

transmitido a los humanos en un 80% por un vector, un insecto hematófago de la familia Triatominae que se conoce comúnmente como chinche hoccón y en un 20% por transfusión de sangre contaminada o por vía congénita. Los humanos y un gran número de especies animales, tanto domésticas como salvajes, constituyen los reservorios naturales de *T. cruzi*.<sup>1,2</sup>

En humanos, la enfermedad presenta dos etapas, una aguda que aparece poco tiempo después de la infección y la otra crónica que aparece después de un periodo silencioso o asintomático que puede durar varios años. Las lesiones de la fase crónica afectan irreversiblemente órganos internos como el corazón, el esófago, el colon y el sistema nervioso periférico.

\* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Carlos Wong-Ramírez. Departamento de Bioquímica, ENCB-IPN, Apartado postal 4-129, 06401 México D.F., México. Correo electrónico: cwong@encb.ipn.mx.

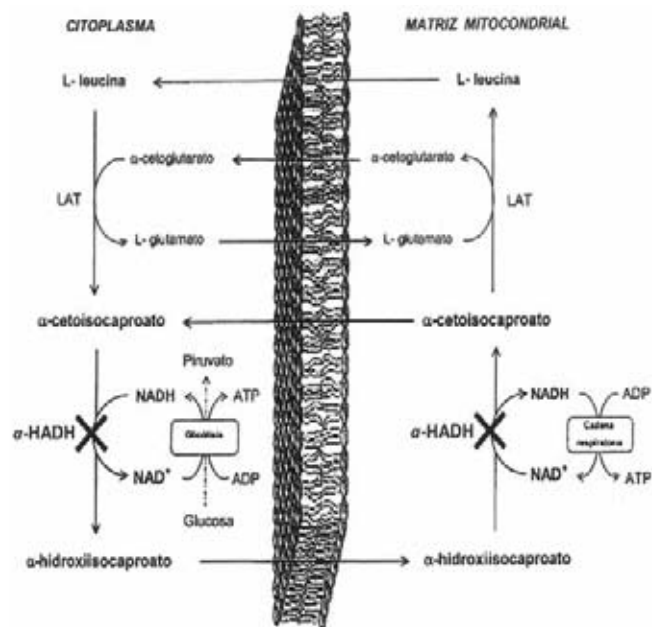
rico. Después del periodo asintomático, un 27% de los individuos infectados desarrollan síntomas cardíacos que los pueden conducir a una muerte súbita, un 6% trastornos digestivos, principalmente megavisceras y un 3% trastornos del sistema nervioso periférico.<sup>1,2</sup>

## Quimioterapia

La enfermedad de Chagas sigue siendo el mayor problema de salud en varios de los países de Latinoamérica; en efecto, los pacientes con la enfermedad crónica severa empeoran progresivamente y con frecuencia mueren debido a un fallo cardíaco. Hasta hoy no existe ningún tratamiento completamente efectivo para esta enfermedad,<sup>3</sup> por lo que permanece prácticamente incurable. Aunado a esto, existe poco interés de la industria farmacéutica para desarrollar nuevos fármacos antichagásicos.<sup>4</sup> El benznidazol (Bz) y el nifurtimox (Nf) son los fármacos disponibles en la actualidad para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, son efectivos durante la fase aguda pero casi no tienen efecto durante la fase crónica. Además, la existencia de cepas de *T. cruzi* resistentes a estos fármacos explica el bajo índice de curación en los pacientes chagásicos. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos fármacos contra la enfermedad de Chagas está plenamente justificada.

## Metabolismo energético del *Tripanosoma cruzi*

Los tripanosomas que se encuentran en la circulación san-



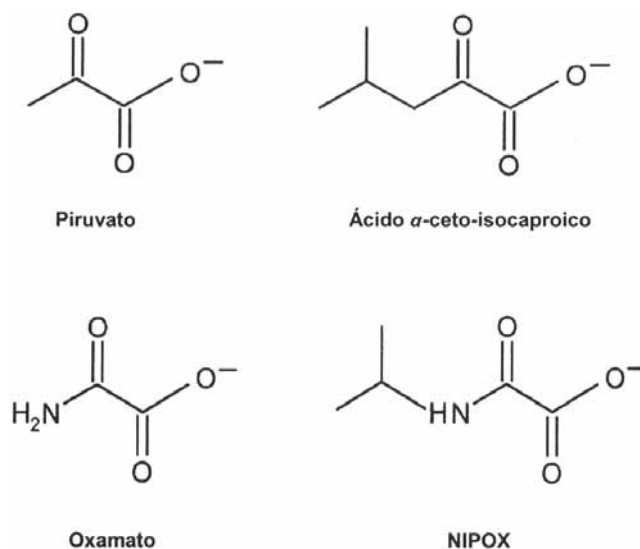
**Figura 1.** Esquema del metabolismo energético de *Tripanosoma cruzi* e inhibición de la  $\alpha$ -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II (HADH).

guinea (tripomastigotes) utilizan solamente glicólisis para generar la energía que requieren para su motilidad y sobrevivencia,<sup>5</sup> por lo que esta vía metabólica se ha visto como un blanco prometedor para el diseño de nuevos fármacos con actividad tripanosomocida.<sup>6,7</sup> Se argumenta que aquellos compuestos capaces de inhibir esta vía metabólica deben lograr una disminución de la motilidad y la muerte del parásito.

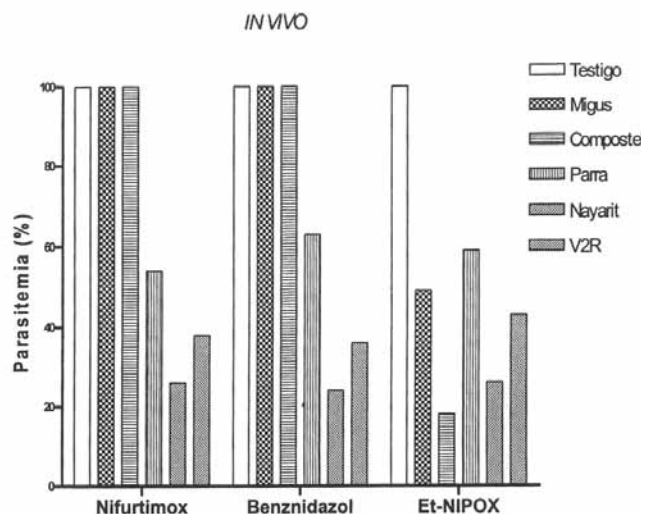
*T. cruzi* posee una enzima llamada  $\alpha$ -hidroxiácido deshidrogenasa (HADH) con dos formas moleculares (HADH-isoenzima I y HADH-isoenzima II) que se han purificado y caracterizado con base en su especificidad de sustratos y sus constantes cinéticas.<sup>8</sup> La isoenzima I es responsable de la poca actividad del lactado deshidrogenasa que se encuentra en extractos de *T. cruzi*,<sup>9</sup> mientras que la isoenzima II no presenta actividad sobre el piruvato<sup>9</sup> pero es activa sobre una amplia gama de sustratos, tanto lineales como ramificados. El ácido  $\alpha$ -ceto-isocaproico es el sustrato sobre el cual presenta su máxima actividad.<sup>8</sup> Se ha demostrado que la HADH-isoenzima II participa en un sistema de lanzadera que le permite a *T. cruzi* transferir los equivalentes reductores (NADH) del citoplasma al interior de la mitocondria,<sup>10</sup> en donde son oxidados en la cadena respiratoria. Además, la HADH isoenzima II participa en la reoxidación del NADH que se genera en la glicólisis (Figura 1).

## Diseño de un inhibidor de la $\alpha$ -HADH-isoenzima II de *Tripanosoma cruzi*

Como ya se mencionó, la glicólisis es la principal ruta metabólica que emplea este parásito, por lo que la inhibición de la isoenzima II podría conducir a una disminución de su motilidad y sobrevivencia.<sup>11,12</sup>



**Figura 2.** Relación química y estructural entre el piruvato y el ácido  $\alpha$ -ceto-isocaproico, sustratos de la  $\alpha$ -hidroxiácido deshidrogenasa y los inhibidores oxamato y NIPOX.

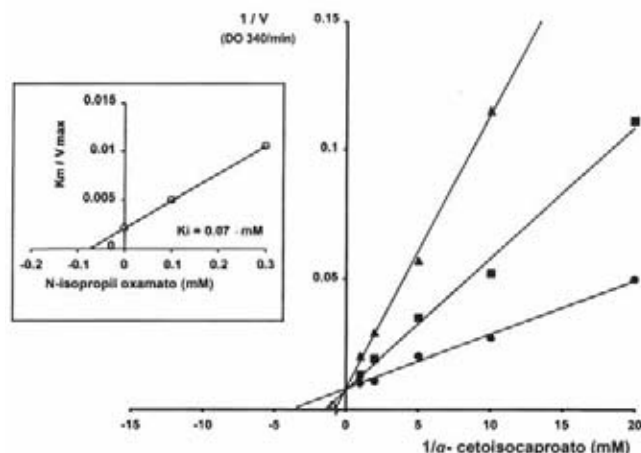


**Figura 3.** Efecto del nifurtimox (Nf), del benznidazol (Bz) y del éster etílico del NIPOX sobre la parasitemia inducida en ratones con diferentes cepas de *T. cruzi*. En el pico máximo de la parasitemia, se administró una sola dosis de fármaco de 500 mg/kg por vía oral y la parasitemia se determinó a las 6 horas de acuerdo con el método propuesto por Filardi y Brener.<sup>18</sup> Tomado de (17).

De acuerdo con lo anterior, diseñamos un compuesto, posible inhibidor de la HADH-isoenzima II de *T. cruzi*, el ácido N-isopropil oxámico (NIPOX),<sup>12</sup> un análogo estructural del ácido  $\alpha$ -ceto-isocaproico. Con base en la similitud estructural de estos dos compuestos (Figura 2), supusimos que el N-isopropil oxamato cumpliría con los requerimientos estéricos y estructurales para comportarse como un inhibidor competitivo y selectivo de la HADH-isoenzima II.<sup>12</sup> Se procedió a la síntesis y la caracterización del NIPOX,<sup>12</sup> el cual resultó ser un excelente inhibidor competitivo y selectivo de la HADH-isoenzima II (Figura 3), pues no tiene efecto sobre otras deshidrogenadas.<sup>12</sup> Los estudios cinéticos mostraron además que la introducción de isopropilo, una cadena hidrocarbonada no polar, en el nitrógeno del oxamato incrementa significativamente la afinidad del NIPOX sobre el sitio activo de la HADH-isoenzima II.<sup>12</sup>

### Mecanismo de acción del éster etílico del NIPOX

También se investigó la actividad tripanosomicida del NIPOX, para lo cual hicimos ensayos en cultivos de epimastigotes. Sorprendentemente no detectamos actividad tripanosomicida con el NIPOX, más bien la encontramos con el Nf y el Bz cuyo efecto tripanosomicida fue evidente.<sup>12</sup> Supusimos entonces que el NIPOX no llegaba al interior del parásito por la carga negativa que presenta su grupo carboxilato a pH fisiológico, ya que los compuestos polares difícilmente atraviesan las membranas biológicas por difusión simple. Para reducir la polaridad de este inhibidor, se sintetizó el éster etílico del NIPOX (Et-NIPOX),<sup>12</sup> para transformar un compuesto polar



**Figura 4.** Efecto del N-isopropil oxamato sobre la HADH-isoenzima II con un homogeneizado de la cepa NINOA de *T. cruzi* y el ácido  $\alpha$ -ceto-isocaproico como sustrato. La concentración de sustrato usada fue 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 y 1 mM; la concentración de NADH se mantuvo constante en 0.12 mM. Ensayos sin (●) y con (■) 0.1 mM o (▲) 0.3 mM NIPOX en la mezcla de reacción. La  $K_m$  para el ácido  $\alpha$ -ceto-isocaproico fue 0.3 mM. La  $K_i$  se muestra en el recuadro en la parte superior izquierda y se determinó en la gráfica de los valores de las pendientes contra la concentración del inhibidor. Tomado de (16).

en uno hidrofóbico que tiene afinidad por las membranas y que las puede atravesar fácilmente por difusión simple. Con este nuevo compuesto, se observó un efecto tripanosomicida mayor que el obtenido con el Nf y Bz;<sup>12</sup> este efecto se debe a que el Et-NIPOX es hidrolizado por las esterasas inespecíficas que posee *T. cruzi*<sup>13,14</sup> y da lugar a la producción *in situ* del NIPOX, el cual inhibe a la HADH-isoenzima II de este parásito, con la consecuente inhibición de su metabolismo energético y reducción de su motilidad y sobrevivencia (Figura 1).<sup>14</sup>

### Efecto del éster etílico del NIPOX sobre la parasitemia

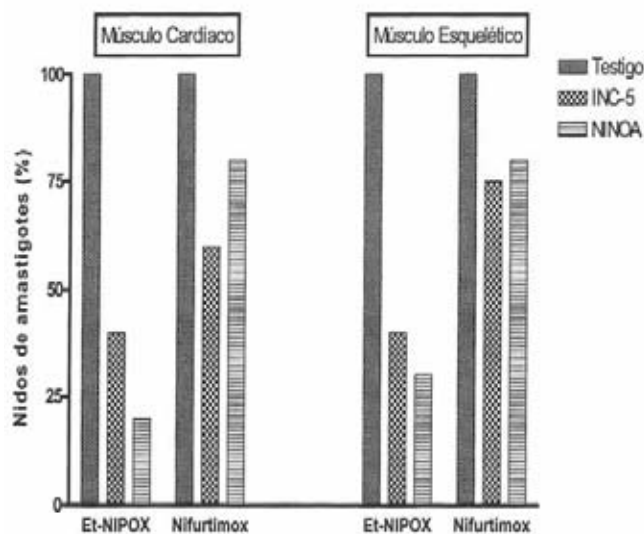
La poca eficacia del Nf y el Bz se debe a que hay cepas resistentes a estos fármacos, por lo que era importante probar el Et-NIPOX, tanto en cepas resistentes como en cepas sensibles a estos fármacos. Así probamos también el efecto de este nuevo compuesto sobre la parasitemia en ratones, inducida por cinco diferentes cepas de *T. cruzi*. En el pico máximo de la parasitemia, se aplicó una sola dosis de 500 mg/kg por vía oral y se determinó la disminución de la parasitemia a las 6 horas. El Et-NIPOX mostró un buen efecto tripanosomicida *in vivo* ya que disminuyó significativamente la parasitemia en las cinco cepas de *T. cruzi* que se estudiaron, mientras que el Nf y el Bz redujeron la parasitemia sólo en tres de estas cinco cepas.<sup>14</sup> Cabe señalar que en una de las cepas (Compoestela), la cual fue resistente a Nf y Bz, la parasitemia promedio de 2.5 millones de tripomastigotes/mL se redujo, con una sola dosis del éster etílico del NIPOX, en un

80% en tan solo 6 horas (Figura 4). Esto sugiere que el Et-NIPOX podría tener un buen efecto tripanosomicida en la fase aguda de la enfermedad de Chagas; es durante esta fase que la parasitemia está en su nivel máximo.

### Efecto del éster etílico del NIPOX sobre amastigotes intracelulares

En la etapa crónica de la enfermedad de Chagas, *T. cruzi* se encuentra en los tejidos principalmente en forma de amastigotes intracelulares (fase replicativa de este parásito) y esto es lo que produce las lesiones irreversibles en órganos internos como el corazón etc., lo que a menudo conduce a una muerte súbita debido a un fallo cardíaco.<sup>1,2</sup>

Por lo anterior, era de vital importancia determinar si el Et-NIPOX podría tener efecto tripanosomicida sobre estos amastigotes intracelulares. Para lograr esto se utilizó un modelo experimental en ratones en los cuales, a los 50 días de parasitados, se alcanzó un máximo de nidos de amastigotes intracelulares sin parasitemia prácticamente. Estudios preliminares muestran que el éster etílico del NIPOX disminuye en un 60 a 80% los amastigotes intracelulares, tanto en el músculo cardíaco como en el esquelético, mientras que el Nf, que se emplea como control positivo, reduce los nidos de amastigotes sólo un 20 a 30% (Figura 5).<sup>15</sup> Estos experimentos sugieren que el Et-NIPOX podría tener un buen efecto tripanosomicida en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.



**Figura 5.** Efecto del nifurtimox Nf y del éster etílico del NIPOX sobre nidos de amastigotes de dos cepas de *T. cruzi*. El tratamiento fue de 10 mg/kg/día por vía oral durante 50 días. Se sacrificaron los ratones y se buscaron nidos de amastigotes en los músculos cardíaco y esquelético. Tomado de (15).

## Discusión

Como la glicólisis proporciona virtualmente toda la energía para los tripomastigotes circulantes, las enzimas que participan en la glicólisis o en su regulación han sido propuestas como blancos bioquímicos para el diseño de fármacos con actividad tripanosomicida.<sup>6,7</sup> De acuerdo con lo anterior se diseñó, sintetizó y caracterizó el ácido N-isopropil oxámico (NIPOX) como posible inhibidor de la  $\alpha$ -hidroxiácido deshidrogenasa (HADH) isoenzima II de *T. cruzi*,<sup>12,14</sup> ya que esta enzima está involucrada en el metabolismo energético del parásito. Esta sustancia demostró ser un excelente inhibidor competitivo y selectivo de la HADH-isoenzima II,<sup>12</sup> pero no mostró ningún efecto tripanosomicida. Supusimos que la polaridad de esta sustancia le impedía penetrar al interior de éste parásito. Para reducir esta polaridad se sintetizó el Et-NIPOX con el cual si se obtuvo la actividad tripanosomicida esperada.<sup>12,14</sup> Esto se debe a que dicho compuesto por ser una sustancia no polar (hidrofóbica) penetra con mayor facilidad al interior de *T. cruzi*; su eficiente hidrólisis dentro del parásito genera el NIPOX,<sup>14</sup> el cual inhibe la HADH-isoenzima II de *T. cruzi* y el metabolismo energético de este parásito con una consecuente disminución de su motilidad y sobrevivencia.<sup>12,14</sup>

Estos experimentos muestran claramente que la elección de la HADH-isoenzima II como blanco bioquímico para tratar de obtener sustancias con actividad tripanosomicida fue acertada ya que el Et-NIPOX mostró un notable efecto tripanosomicida tanto en epimastigotes en cultivo como en tripomastigotes sanguíneos<sup>12,14</sup> y amastigotes intracelulares;<sup>15</sup> estos últimos son los responsables de las lesiones irreversibles producidas principalmente en corazón, las cuales conducen a la muerte de los pacientes. Además el Et-NIPOX mostró mejor efecto tripanosomicida que el Nifurtimox y el Benznidazol, mostrando incluso efecto en cepas de *T. cruzi*; resistentes a estos fármacos.<sup>12,14</sup>

Estos hallazgos sugieren que el Et-NIPOX podría tener un buen efecto tripanosomicida tanto en la fase aguda, caracterizada por abundantes tripomastigotes circulantes, como en la fase crónica de la enfermedad de Chagas cuando la mayoría de los parásitos se encuentran en los tejidos.

## Referencias

1. World Health Organization. Chagas disease special program for research and training in tropical diseases. 1993, pp 67-75.
2. World Health Organization. Control of Chagas disease. Tech Rep Ser. 2002;905:1-109.
3. Urbina JA. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:349-355.
4. Coura RJ, De Castro S. A critical review on Chagas disease. Chemotherapy 2002;97:3-24.
5. Oppenheimer FR. Biochemical peculiarities of trypanosomes, African and South American. Br Med Bull 1985;41:130-136.
6. Bakker BM, Westerhoff HV, Oppenheimer FR, Michels PAM. Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. Mol Biochem Pharmacol 2000;106:1-10.
7. Verlinde CL, Hannaert V, Blonski C, Willson M, Perie JJ, Fothergill-Gilmore IA, et al. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. Drug Resist Update 2001;41:130-136.
8. Coronel CE, Roval LE, Gerez-de Burgos NM, Burgos C, Blanco A. Properties of  $\alpha$ -hydroxyacid dehydrogenase isozymes from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1981;4:29-38.

9. **Coronel C, Gerez-de Burgos NM, Burdos C, Blanco A.** Separación y propiedades catalíticas de las isoenzimas de la  $\alpha$ -hidroxiácido deshidrogenasa de *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)* 1980; 40:159-164.
10. **Montamat EE, Arauso SS, Blanco A.** Subcellular localization of leucine aminotransferase and  $\alpha$ -hydroxyacid dehydrogenase in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1987;22:185-93.
11. **Gerez de Burgos NM, Burgos C, Montamat EE, Rovai LE, Blanco A.** Inhibition by gossypol of oxidoreductases from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Pharmacol* 1984;33:955-959.
12. **Elizondo S, Chena MA, Rodríguez-Paez L, Noguera B, Baeza I, Wong C.** Inhibition of *Trypanosoma cruzi*  $\alpha$ -hydroxyacid dehydrogenase isozyme II by N-isopropyl oxamate and its effect on intact epimastigotes. *J Enz Inhib Med Chem* 2003;18:265-271.
13. **Adunate J, Repeto V, Letelier M, Morillo A.** The carboxyl esterases of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol* 1987;86:67-71.
14. **Chena M, Elizondo S, Rodríguez-Páez L, Noguera B, Baeza I, Wong C.** Trypanocidal activity of N-isopropyl oxamate on culture epimastigotes and murine trypanosomiasis using different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Enz Inhib Med Chem* 2005;20:189-197.
15. **Zaragoza M.** Efecto tripanosomicida de tres ésteres etílicos de oxamatos N-sustituidos, sobre estadios de *Trypanosoma cruzi*, presentes en huésped vertebrado. Tesis de Maestría ENCB-IPN, 2005.
16. **Noguera B.** Desarrollo de inhibidores de oxidoreductasas de *T. cruzi* con posible actividad tripanosomicida. Tesis Doctoral ENCB-IPN, 1995.
17. **Elizondo S.** Estudio de inhibidores de la  $\alpha$  hidroxíácido deshidrogenada de *Trypanosoma cruzi* con posible actividad tripanosomicida. Tesis de Maestría ENCB-IPN, 1999.
18. **Filardi L, Brener Z.** Rapid method for testing in vivo the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984;79:221-225.