

# Candidatos a fármacos para combatir Chagas

Por Graciela Mahler\*

**Los integrantes del laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Química de la Universidad de la República (UdelaR) han estado incursionando en nuevas metodologías para el descubrimiento de sustancias bioactivas contra la enfermedad de Chagas. Los resultados son auspiciosos.**

La Química Medicinal tiene como principal objetivo el diseño, la síntesis y el desarrollo de nuevos compuestos que sean adecuados para el uso terapéutico en humanos o animales. Esta es una ciencia netamente interdisciplinaria que trabaja en la interfase con muchas otras ciencias como son la química orgánica, la inorgánica, la bioquímica, la química computacional, la farmacología, la farmacognosia, la biología molecular, la estadística y la fisicoquímica, entre otras.

Se les llama sustancias bioactivas a los compuestos que al interactuar con una biomolécula (proteína, ARN, ADN, polisacárido, etc.) promueven o inhiben su función biológica. En Uruguay la preparación de este tipo de sustancias es un campo relativamente nuevo que ha venido desarrollándose de manera continua y creciente desde fines de los años 80 comienzo de los años 90, debido fundamentalmente a que las políticas de investigación y desarrollo comenzaron a fomentarse desde ese entonces.

Los integrantes del laboratorio de Química Farmacéuti-

ca de la Facultad de Química de la Universidad de la República (UdelaR), vienen trabajando desde hace ya dos décadas en este campo. En los últimos cuatro años parte del grupo ha estado incursionando en nuevas metodologías para el descubrimiento de sustancias bioactivas contra la enfermedad de Chagas.

## Diseño

El diseño basado en la estructura (*structure based drug design* en inglés) es una metodología de búsqueda de compuestos bioactivos. Se trata de una forma de trabajo basada en el conocimiento previo de una biomolécula de relevancia en algún paso metabólico (1) importante para la enfermedad, lo que se llama diana biológica, y su inhibición puede significar la cura de la enfermedad por la muerte del parásito o por la inhibición de su crecimiento.

En el sentido más básico, el diseño de fármacos consiste en el diseño de pequeñas moléculas que son complementarias en forma y carga con la diana u objetivo biológico al que se quiere combatir y con quien interactúan uniéndose a ella.

En el diseño de fármacos muchas veces se utilizan técnicas computacionales para su implementación. Este tipo de enfoque se refiere a menudo como "diseño de fármacos asistido por computadoras".

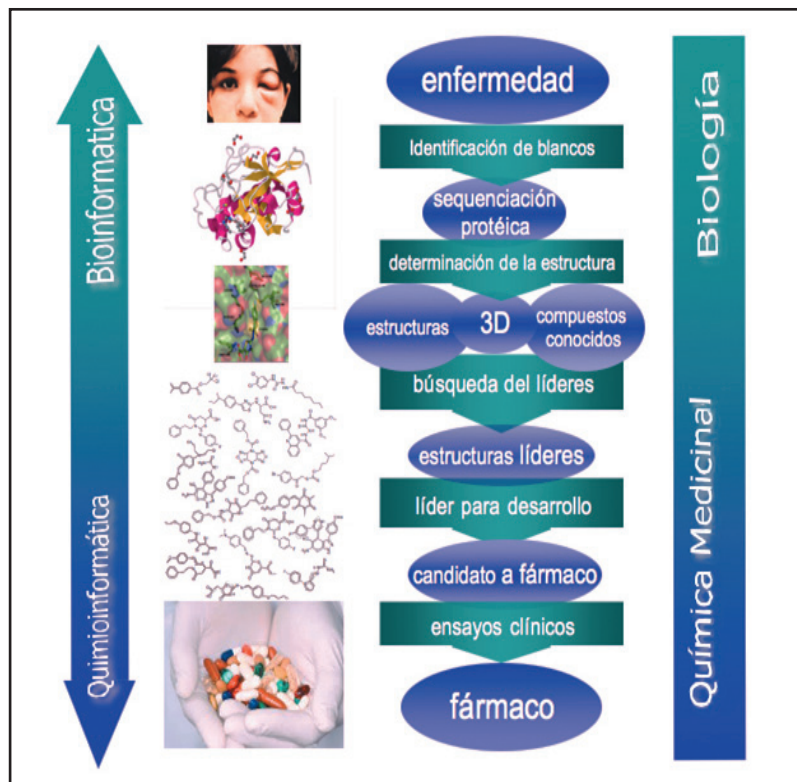
En el laboratorio de Química Farmacéutica se trabaja principalmente en las etapas de diseño, búsqueda de "líderes" y preparación de candidatos a fármacos.

Los líderes son compuestos cuya estructura química posee una determinada acción biológica. Una vez descubierto un líder se hace una optimización del mismo, es decir se preparan moléculas semejantes y se evalúa su actividad biológica con el fin de mejorar algunas de las propiedades deseadas, por ejemplo: absorción, potencia, distribución, para que sean aun mejores al compuesto de partida.

Para que los candidatos a fármacos se transformen en drogas son necesarias etapas posteriores que requieren una inversión económica considerable y que involucran generalmente a la industria farmacéutica.



Chiara Pizzo trabajando con el reactor asistido por microondas del laboratorio



Etapas en el desarrollo de un fármaco basado en la estructura.

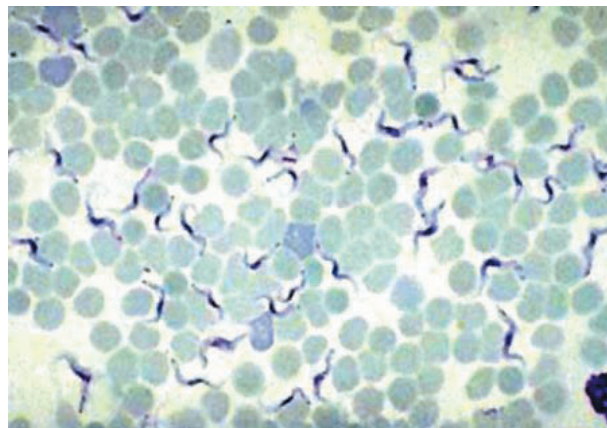
crónico en las zonas endémicas.

La enfermedad en el hombre, de acuerdo a la OMS, presenta dos estados: una fase aguda, que dura de seis a ocho semanas, y la fase crónica, que puede desarrollarse posteriormente luego de diez años.

En la primera etapa, la mayoría de los pacientes infectados resultan asintomáticos, lo que impide en muchos casos que la enfermedad sea detectada, dependiendo del lugar de la picadura. Por ejemplo, cuando ésta ocurre a través de la mucosa ocular, uno de los síntomas más comunes es el edema de un solo párpado, además de fiebre y dolores musculares. En pacientes inmuno-deprimidos puede ocurrir el fallecimiento, pero generalmente los síntomas desaparecen y se produce una etapa de latencia hasta que se observan nuevamente los síntomas de la etapa crónica luego de 10 a 20 años.

En la etapa crónica en general los parásitos permanecen alojados en un estadio intracelular en órganos con tejido muscular liso, como son el corazón e intestino, o en el tejido nervioso. La enfermedad puede manifestarse de diferentes formas clínicas a) asintomáticos que es la más frecuente y es el comienzo de la etapa crónica; b) forma cardíaca en el 30% de los casos, lo que conduce a arritmias, cardiomiopatías, y finalmente falla cardíaca; c) lesiones digestivas como agrandamiento de esófago o colon, y combinaciones de b) y c).

Las drogas actualmente utilizadas para el tratamiento de la enfermedad son Benznidazol y Nifurtimox, introducidas hace más de 25 años. Éstas han demostrado su eficacia en la etapa aguda de la enfermedad, pero con importantes efectos adversos, que incluyen las náuseas, anorexia, pérdida de peso, pérdida de memoria, desórdenes del sueño, irritación gástrica, que comúnmente resul-



*Trypanosoma cruzi* en sangre

### Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una infección endémica en Latinoamérica, en donde se estima que existen 10 millones de personas infectadas cada año, de las cuales mueren unas 50.000 (0,5%). La enfermedad tiene mayor prevalencia en las regiones rurales más pobres de América Latina.

Esta enfermedad es ocasionada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, un parásito que necesita dos seres vivos para completar su ciclo de vida: un insecto y un mamífero. En cada uno de ellos sufre diferentes transformaciones; el ciclo se inicia cuando un insecto que se alimenta de sangre, infectado con el tripanosoma, pica a un ser humano y defeca en la herida. Ejemplares del estadio del parásito llamados tripomastigotes metacíclicos, que se encuentran en las heces del insecto entran en el huésped a través de la herida, o porque atraviesan las membranas mucosas. Viajan por el torrente sanguíneo hasta penetrar en una célula humana, donde se convierten en amastigotes, y se reproducen formándose los llamados pseudoquistes. Luego los amastigotes se transforman nuevamente en tripomastigotes y la célula estalla. Así se vuelcan nuevamente al torrente sanguíneo y vuelven a infectar otra célula, repitiéndose el ciclo de multiplicación.

En el Uruguay la transmisión se produce a través del insecto *Triatoma infestans* conocido como vinchuca. Si bien la transmisión por picaduras está prácticamente erradicada, aun quedan numerosos casos de Chagas

tan en la discontinuidad del tratamiento. Además, su uso en la etapa crónica resulta efectivo en el 8% de los casos, por lo que existen en Latinoamérica millones de personas afectadas por la enfermedad para quienes aún no hay tratamiento. Es por ello que la búsqueda de nuevos fármacos menos tóxicos y más efectivos para el tratamiento de esta enfermedad está plenamente justificada.

## Cruzipaína

Hace ya unos 15 años se descubrió que la cisteína endopeptidasa (2) más abundante del *Trypanosoma cruzi*, llamada cruzipaína, es la enzima responsable de la mayor actividad proteolítica (3) del mismo.

La inhibición de dicha enzima resulta en la muerte del parásito y por lo tanto en la cura de la enfermedad, sin resultar tóxico para el huésped. Como aun no hay drogas en el mercado que actúen por este mecanismo, solo se han estudiado algunos inhibidores en modelos animales en los que se ha curado la enfermedad.

En los últimos años se han encontrado numerosos inhibidores, pero en la actualidad únicamente la vinilsulfona K777 se encuentra en etapa de estudios clínicos avanzados para su uso en humanos.

Para realizar la búsqueda de inhibidores de cruzipaína el equipo del laboratorio de Química Farmacéutica utilizó la enzima obtenida a partir del extracto de *Trypanosoma cruzi* y purificada en los laboratorios del Prof. Juan José Cazzulo de la Universidad Nacional de San Martín, Argentina.

Para la medida de la inhibición de la enzima se trabajó en la puesta a punto, el ensayo y la determinación del modo de inhibición de los compuestos competitivos *versus* no-competitivos, lo que se llama habitualmente caracterización bioquímica de los inhibidores. Este trabajo se realizó en colaboración con el Prof. Gustavo Salinas y Martín Fló de la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Química, UdelaR.

El trabajo con el parásito se realizó a cargo del Dr. Carlos Robello y Paula Faral en la Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo; allí se hicieron los ensayos para comprobar que los compuestos, además de inhibir a la enzima, efectivamente eran capaces de matar a los parásitos de *Trypanosoma cruzi* sin matar las células de los mamíferos.

Para elegir los compuestos a sintetizar exploramos dos estrategias: el *screening* o cribado virtual de una colección de compuestos químicos, usualmente llamada "biblioteca", que se encuentran en una base de datos y una metodología clásica de reemplazo isostérico de un azufre por selenio.

## Screening Virtual

El *screening* o cribado virtual es una metodología asistida por computadoras muy utilizada en la actualidad por las compañías farmacéuticas. Esta forma de trabajo utiliza una función matemática llamada Función Discriminante para predecir la actividad de los compuestos de una "biblioteca". La parte más importante para el éxito de esta metodología es la construcción de la función discriminante. La búsqueda y construcción de la misma se realizó en colaboración con el grupo del Prof. Luis Bruno-Blanch de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Esta función fue construida en base a estructuras descritas en la bibliografía que informaban de altos valores de inhibición sobre la enzima cruzipaína. Una vez elegida la función discriminante, se realizó el *screening* en una base de datos de 500.000 compuestos de la base de datos pública ZINC. La función predijo una serie de estructuras que serían potenciales candidatos para inhibir la enzima.

De los posibles candidatos se eligió preparar aquellos compuestos que pudieran sintetizarse de manera rápida y económica para luego ser evaluados en la enzima, para comprobar si las hipótesis eran ciertas y resultaban ser inhibidores de la enzima.

Para la preparación de estos compuestos se exploró el uso de reacciones en tándem y la utilización de reactores (donde llevar a cabo las reacciones químicas) asistidos por microondas.

Las reacciones en tándem son aquellas que permiten ir agregando los reactivos sucesivamente sin tener que purificar los intermedios de la reacción. Por otra parte la síntesis de sustancias orgánicas asistida por microondas ha recibido mucha atención en los últimos años, debido a que acorta los tiempos de calentamiento por aumentar la velocidad de reacción y muchas veces mejora el rendimiento. Los microondas de uso para síntesis son diferentes de los de uso doméstico y deben ser diseñados especialmente con dicho fin.







Cecilia Saiz y Valerie Castillo trabajando en el laboratorio.

La aplicación de estas metodologías permitió preparar los compuestos deseados en forma rápida y eficiente; reacciones que habitualmente necesitan 12 horas de reflujo pueden prepararse en 6-12 minutos con mínima utilización de solventes, lo que ofrece una ventaja considerable ya que minimiza la cantidad de éstos, genera pocos residuos y además requiere de menos tiempo y energía.

Desde el punto de vista biológico los compuestos resultaron débiles como inhibidores de cruzipaina, pero sin embargo algunos de ellos presentaban actividad tripanocida (que destruye los tripanosomas), resultando interesantes puntos de partida para seguir explorando este tipo de estructuras, aunque no se sabe cuál es el mecanismo por el que matan al parásito.

## Reemplazo del Azufre

En base a estructuras de compuestos conocidos como inhibidores reversibles de cruzipaina llamadas tio-semicarbazonas, se decidió preparar análogos de estos compuestos, cambiando el átomo de azufre por el de selenio. Esta es una metodología tradicional en la química farmacéutica, que consiste en reemplazar un átomo por otro que posea similar densidad electrónica, y evaluar su actividad biológica. El selenio comparte propiedades electrónicas con el azufre ya que están en el mismo grupo de la tabla periódica por lo que se pensó

que su introducción podría ser beneficiosa.

Para ello se prepararon una serie de seleno-semicarbazonas nuevas y se evaluaron como inhibidores de cruzipaina.

Los resultados indican que los análogos de selenio son más potentes que los análogos de azufre, que inhiben la enzima y también el crecimiento del parásito. Además algunos de estos compuestos resultaron más activos y menos tóxicos que el beznidazol, la droga de referencia utilizada en la actualidad.

En este proyecto se comenzó a trabajar en el año 2007; la parte sintética y evaluación en la enzima ha sido llevada a cabo por las estudiantes de doctorado Q.F. Chiara Pizzo y Q.F. Cecilia Saiz, durante su transcurso se han explorado campos muy diversos de la química y de la interfase entre la bioquímica y la parasitología.

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos han sido alentadores, el equipo se ha propuesto continuar con la preparación de compuestos para la búsqueda de inhibidores enzimáticos que afecten sistemas biológicos de importancia en la salud humana o animal.

### Notas

(1) *Metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que ocurren dentro de una célula de un organismo vivo, con el fin de producir la energía necesaria para el desarrollo de sus funciones vitales.*

(2) *La cisteína endopeptidasa es una endopeptidasa que tiene una cisteína involucrada en el proceso catalítico. Una endopeptidasa es una enzima de gran tamaño que degrada las proteínas. Las enzimas son proteínas que hacen que las reacciones ocurran mucho más rápidamente. Las proteínas están compuestas de cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Las endopeptidasas rompen los enlaces peptídicos de los aminoácidos de la proteína, en contraste con las exopeptidasas, que cortan la proteína en los extremos.*

(3) *Una enzima proteolítica, es una molécula (proteína) con capacidad de catalizar o escindir a otra proteína específica en sus aminoácidos constitutivos, necesaria quizá para un ciclo biológico.*

\* **La Dra. Graciela Mahler** es Profesor Adjunto en la Cátedra de Química Farmacéutica, Facultad de Química, Universidad de la República.



Uruguay  
Nombre de origen guaraní. Existen distintas posturas sobre el significado del mismo: río del país del urú, río de los caracoles o la versión poética de Juan Zorrilla de San Martín, río de los pájaros pintados.

Sólo con el aviso ya aprendiste algo nuevo

www.montecable.com  
2 909 00 00

\* Paquete exclusivo con costo mensual adicional

mundo & conocimiento



MONTECABLE  
DIGITAL HD  
El Gran Espectáculo