

Rachel Ramos Granja^{1,2}, Diego Benítez³, Marcelo Comini³, Guzmán Álvarez², Elena Aguilera¹

1-Grupo de Química Orgánica Medicinal, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, 11400, Uruguay,
2-Laboratorio de Moléculas Bioactivas, Centro Universitario Litoral Norte, Universidad de la República, Paysandú, 60000, Uruguay.
3-Biología Redox de Tripanosomas, Institut Pasteur de Montevideo, 11400, Uruguay.

eaguilera@fcien.edu.uy

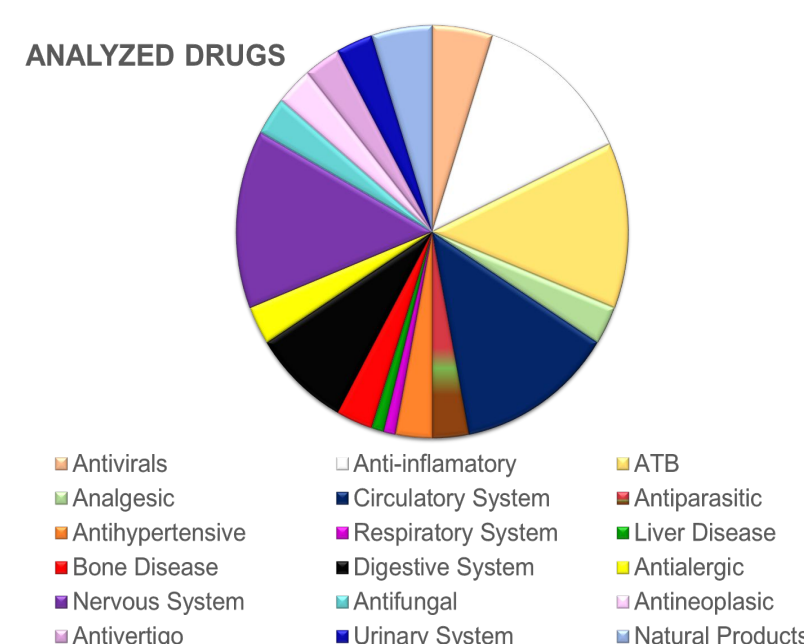
INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis Visceral (LV) es una enfermedad tropical parasitaria desatendida causada por 2 especies de protozoos del género *Leishmania*, *infantum* (LI) y *donovani*, la cual, si es sintomática y no es tratada a tiempo puede causar la muerte. El tratamiento no es efectivo, causando severos efectos secundarios. La estrategia en el que se enfocó este trabajo fue el reposicionamiento de fármacos y la polifarmacología en búsqueda de sinergismo [1, 2]. El criterio y selección de los fármacos fueron el acceso y frecuencia de uso en países subdesarrollados.

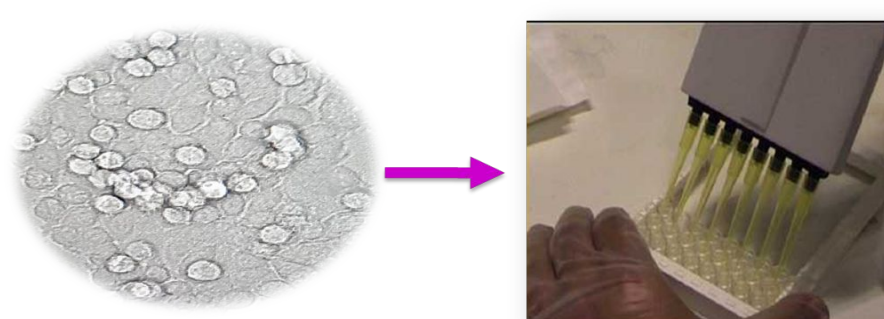
METODOLOGÍA

Reposicionamiento de fármacos

115 fármacos



Citotoxicidad

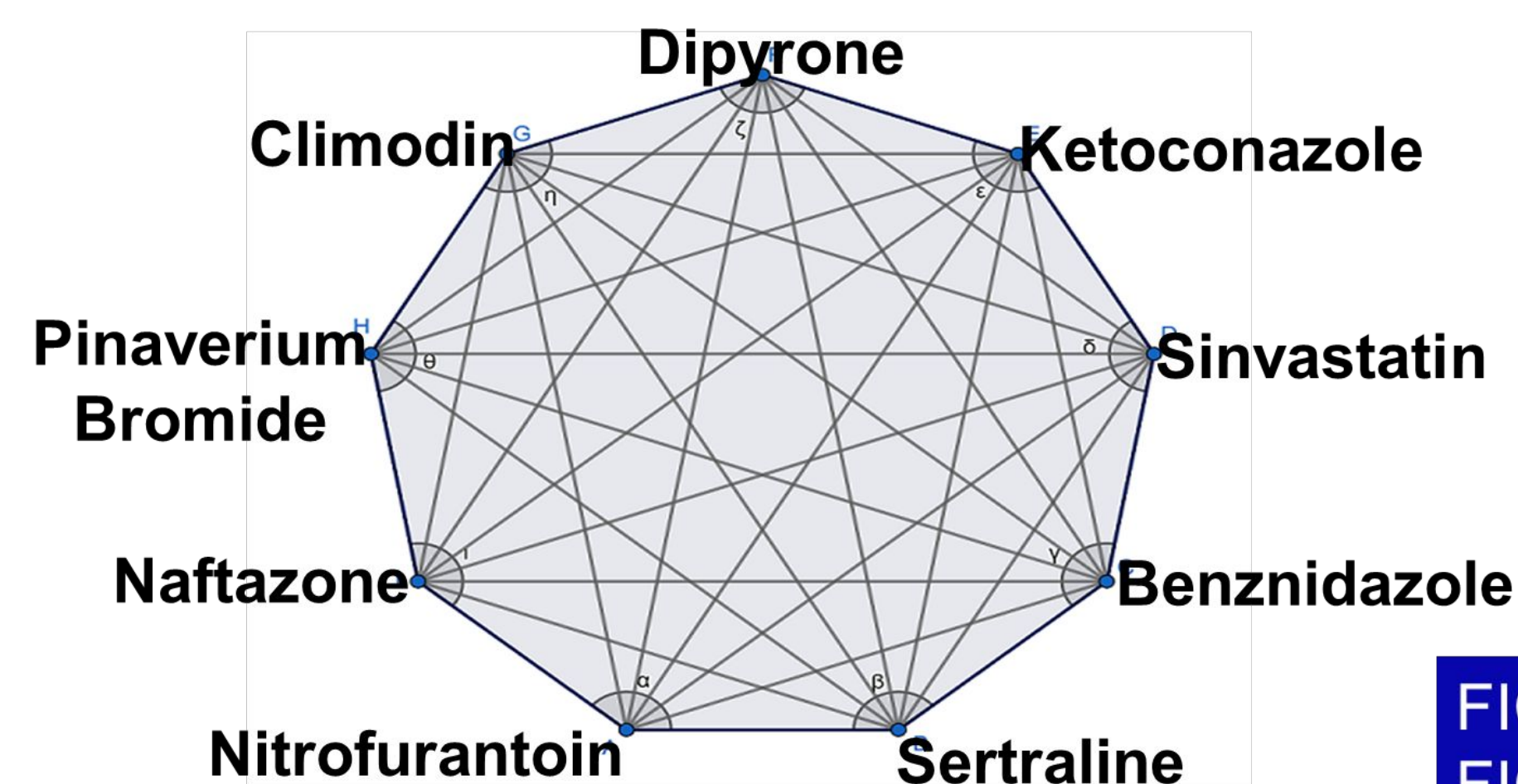


CC₅₀

Promastigotas de LI cepa MHOM/MA/67/ITMAP263 fueron cultivados a 28°C en medio con base BHI. Se siembra a una concentración de 100 μM en placa, por 5 días y los activos (que inhiben más del 50% el crecimiento a esa concentración) se repite a menores dosis. Se calcula la concentración que inhibe el 50% de crecimiento (CI₅₀) [4].

Células HRT-18 se incuban en placa de 96 pocillos de fondo plano por 48 horas a 37°C y 5% de CO₂. Los fármacos son evaluados a una concentración de partida de 500 μM y si a esa concentración se inhibe más del 50% del crecimiento celular se bajan dosis. Luego de las 48 horas se mide la viabilidad celular por MTT. Se calcula la citotoxicidad celular con estos datos que cause el 50% de la muerte de estas células (CC₅₀) [4].

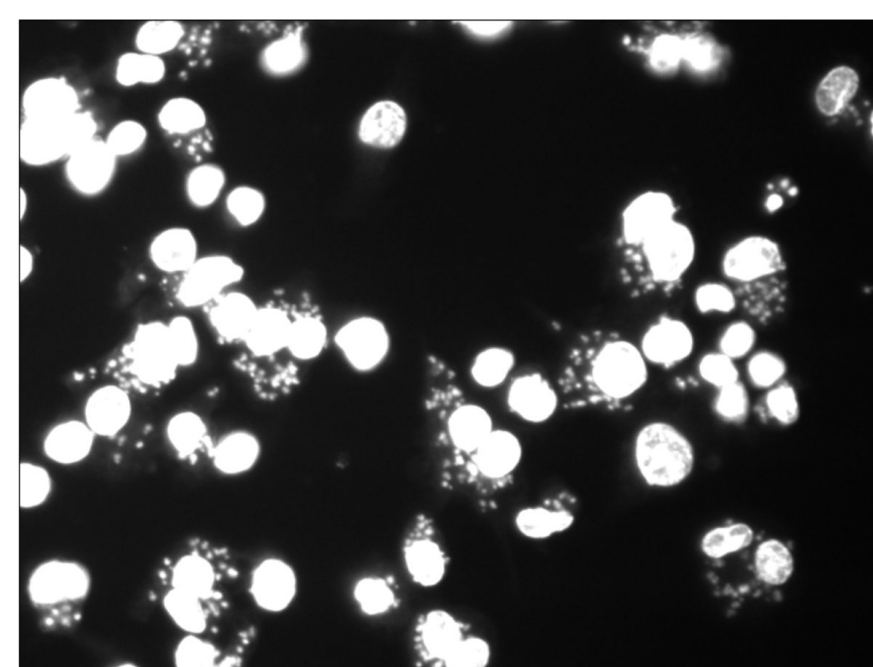
COMBINACIÓN DE FÁRMACOS ACTIVOS EN LA FORMA PROMASTIGOTA DE LI



$$FICI = \frac{CI_{50}(A \text{ comb})}{CI_{50}(A)} + \frac{CI_{50}(B \text{ comb})}{CI_{50}(B)}$$

FICI < 1 EFECTO SINÉRGICO
FICI > 1 EFECTO ANTAGÓNICO
FICI = 1 EFECTO ADITIVO

ENSAYOS EN MACRÓFAGOS INFECTADOS DERIVADOS DE LA LÍNEA HUMANA THP-1 [4]



Macrófagos infectados con LI - DMSO

Una línea bioluminiscente de LI, cultivada en medio con base RPMI, a 28°C fue utilizada en fase estacionaria para infectar macrófagos derivados de la línea monocítica THP-1, en una relación 1: 5. Luego, 200 μL de esta suspensión fueron plaqueados, distribuyendo 150000 macrófagos por pocillo de placa de 96, incubado a 5% CO₂ a 37 °C por 24 h. Después de remover el sobrenadante, se lava con PBS precalentado a 37°C y se incuban con los fármacos por 4 días. La actividad luciferasa se mide usando el reactivo "Luciferase Assay System E4530 (Promega)" y el Luminómetro LUMistar OPTIMA. Todas las condiciones fueron medidas por cuadruplicado, 3 se revelan por luminiscencia y 1 por microscopía [3].

OBJETIVOS

Reposicionamiento de fármacos frecuentemente usados en países subdesarrollados y combinaciones binarias de los más activos.

RESULTADOS

EVALUACIÓN DE COMPUESTOS

ENSAYOS EN PROMASTIGOTAS Y CITOTOXICIDAD EN CELULAS MAMÍFERAS

Tabla 1. ^a CI₅₀ de LI en la forma promastigota. ^b CC₅₀ en células de cáncer humanas HRT-18. ^c Índice de selectividad calculado como la relación CC₅₀/CI₅₀. ND=No determinado

Fármacos	^a CI ₅₀ ±DS(μM) LI promastigota	^b HRT-18 CC ₅₀ ±DS (μM)	^c Índice de selectividad
Dipyrone	57±6	342±20	6
Ketoconazol	5±1	71±8	15
Climodin	20±1 μg/ml	53±3 μg/ml	3
Benznidazol	10±1	368±20	38
Sinvastatina	24±1	118±8	5
Sertralina	27±1	13±1	~0,5
Nitrofurantoina	21±2	103±5	5
Bromuro de Pinaverio	28±1	27±7	~1
Naftazona	2,0±0,1	153±10	72
Amlodipina	45±3	153±10	3
Carvedilol	75±5	ND	ND
Clomipramine	75±5	ND	ND
Fármaco X	72±6	130±7	~2
Miltefosine	0,79±0,08	18±2	23

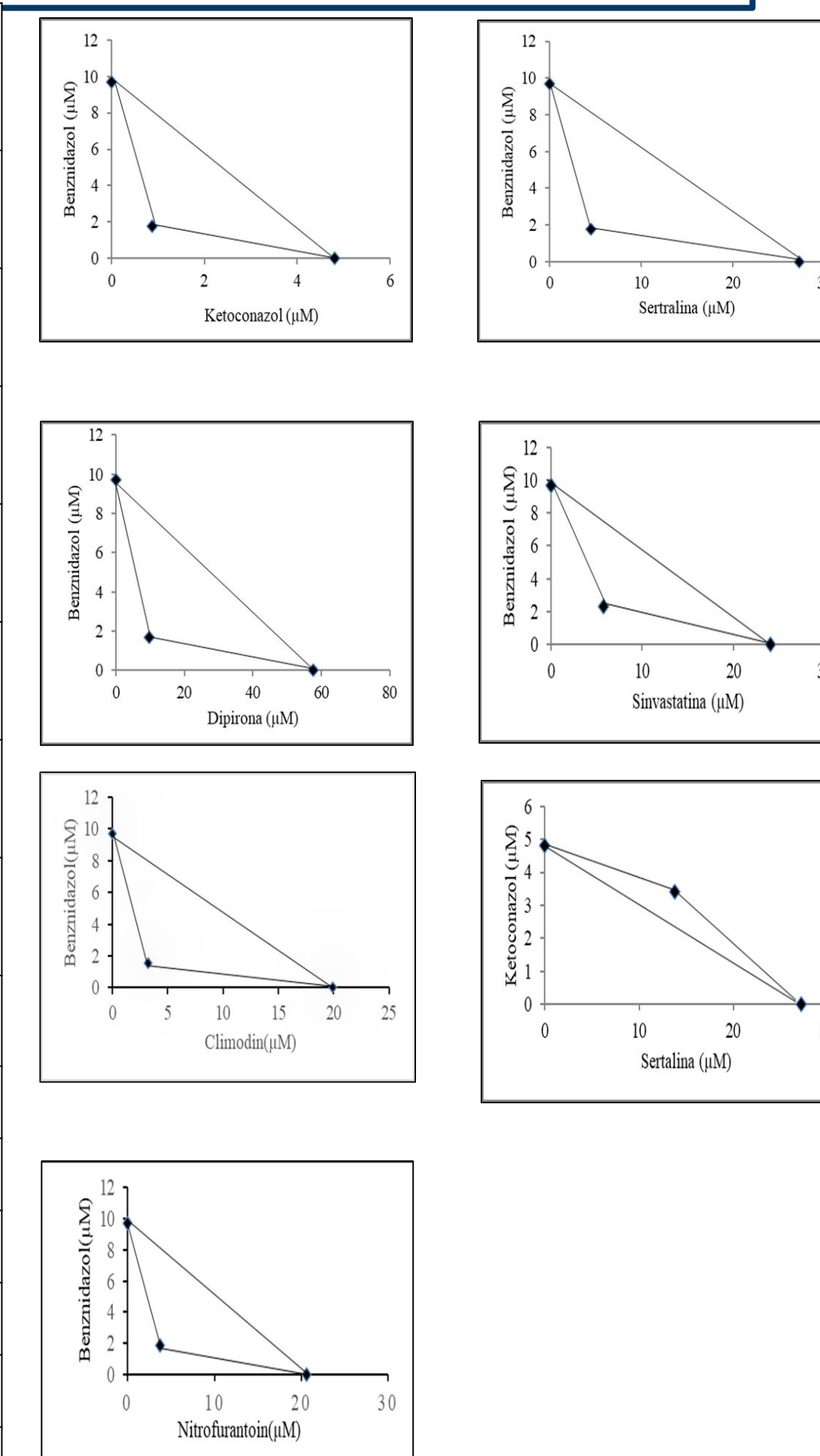


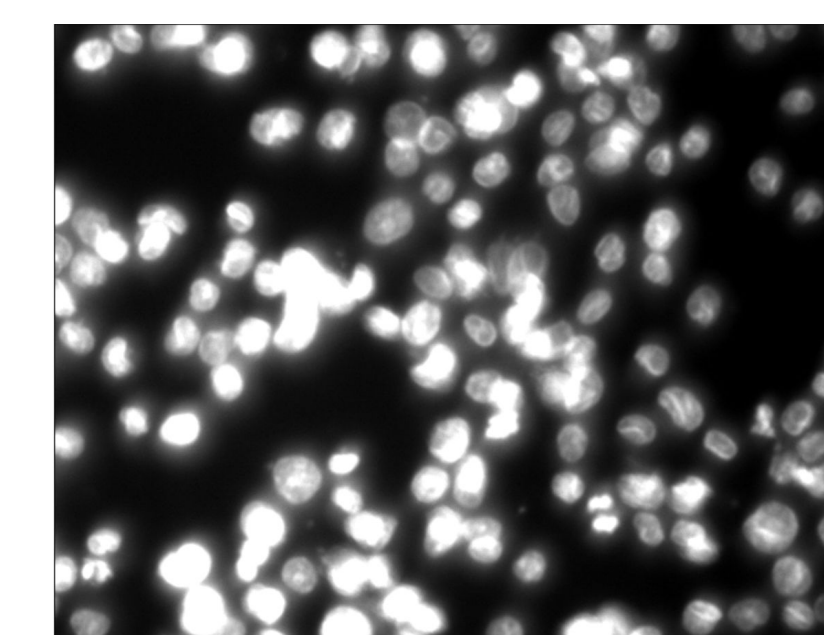
Fig. 1. Isobologramas mostrando las 6 combinaciones binarias sinérgicas obtenidas. Solo se muestra 1 gráfico de una combinación con efecto antagónico

ENSAYOS EN MACRÓFAGOS INFECTADOS DERIVADOS DE LA LÍNEA HUMANA THP-1

Se ensayaron los fármacos activos, algunos descritos en LI con actividad en la forma amastigota como se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. CI₅₀ de LI en la forma amastigota.

Fármacos	Viabilidad (%) @ 20 μM, o CI ₅₀ (μM) LI, amastigota
Climodin	100 ± 1 @ 20 μg/ml
Sertralina	14±1
Bromuro de Pinaverio	84 ± 13
Naftazona	120±17 @ 62.5 μM
Amlodipina	1,4±0,5
Carvedilol	0,425±0,025
Clomipramine	13±1
Fármaco X	13±2
Miltefosina	5,0±0,8



Macrófagos infectados con LI - Fármaco X, 20 μM

Nuevo fármaco con actividad en el orden micromolar versus la forma amastigota de LI. Datos preliminares en un modelo de infección de macrófagos derivados de médula ósea, muestran que mantiene actividad.

CONCLUSIONES

Se analizaron 115 fármacos para diferentes patologías disponibles en Uruguay sobre la forma promastigota de LI, resultaron con actividad leishmanicida 13 de ellos. Posteriormente se realizaron combinaciones de dos medicamentos con sus respectivos isobologramas encontrando 6 combinaciones con efectos sinérgicos. Es novedoso que todos ellos presentan **diferente mecanismo de acción** potenciando su actividad. Lo anterior mencionado promete seguir con estudios preclínicos en la forma amastigota.

Ocho de 13, se evaluaron en la forma amastigota, intracelular y clínicamente relevante, 5 resultaron activos, uno de ellos sin precedentes de actividad anti-*Leishmania*.

Considerando la discordancia de resultados entre ambos estadios, tanto en actividad, como potencia, se destaca la importancia de trabajar en el estadio intracelular y clínicamente relevante del parásito.