

Actividad tripanocida de nuevos quelantes heterocíclicos

Pablo Escario Gómez. Miguel de Górgolas Fernández-Chacón.

Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Plaza Ramón y Cajal. 28040 Madrid
pescario@estumail.ucm.es

Cristina Fonseca Berzal. Alicia Gómez Barrio.

Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Plaza Ramón y Cajal. 28040 Madrid
crfonseca@ucm.es

Resumen: se evalúa la actividad, frente a *Trypanosoma cruzi*, de cuatro nuevos derivados de fenantrolina y dos imidazoles. Para ello, se ensayaron sobre cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa CL transfectada con el gen de la β - galactosidasa de *Escherichia coli*) y se determinó su citotoxicidad sobre fibroblastos murinos. La lectura de resultados en epimastigotes se efectuó por espectrofotometría después de añadir el sustrato CPRG, y sobre los fibroblastos, por espectrofluorimetría tras la adición del indicador de viabilidad celular resazurina. Como tendencia general se observó una notable actividad (en torno al 80%) frente a los epimastigotes de *T. cruzi*, pero resultaron citotóxicos; a excepción de dos de los compuestos, que no producían efectos tóxicos significativos sobre los fibroblastos, lo que demuestra que su actividad tripanocida es selectiva.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*. Fenantrolina. Epimastigotes. Fibroblastos.

INTRODUCCIÓN

Según datos de la OMS⁽¹⁾, la enfermedad de Chagas afecta a más de 8 millones de personas en Centro y Sudamérica, donde el principal mecanismo de transmisión es el vectorial (chinchas triatomíno). La existencia de otras vías de infección, como la transfusión sanguínea y la transplacentaria, y la inmigración de personas infectadas procedentes de América Latina⁽²⁾ son responsables de que se esté diagnosticando en países no endémicos, como EEUU y España. A pesar de ser una enfermedad emergente, los únicos tratamientos disponibles son dos fármacos descubiertos hace más de 40 años, un nitrofurano (Nifurtimox), y un nitroimidazol (Benznidazol). Son activos sobre la fase aguda de la enfermedad, con un 80% de éxito terapéutico, pero sobre la enfermedad crónica, que es la presentación clínica más frecuente en Latinoamérica, el porcentaje de fracasos terapéuticos alcanza el 80%. Además, producen con mucha frecuencia importantes efectos secundarios, como anorexia, vómitos, dermatopatías alérgicas, dado que los tratamientos son muy prolongados⁽³⁾.

Estos hechos demuestran la urgente necesidad de desarrollar fármacos más eficaces y menos tóxicos. Entre los compuestos de síntesis que han demostrado efectos inhibitorios sobre el crecimiento de patógenos, algunos grupos de investigación están trabajando con quelantes de metales, basados en 1,10-fenantrolinas, por sus efectos sobre la función mitocondrial. Tal es el caso de la levadura *Candida albicans*⁽⁴⁾, el protozoo causante de la malaria *Plasmodium falciparum*⁽⁵⁾, así como *Trypanosoma brucei*⁽⁶⁾. Como la mayoría de los organismos, los tripanosomas necesitan hierro para atender a algunos procesos metabólicos cruciales para su supervivencia, como son la replicación de ADN, la defensa antioxidante y la respiración mitocondrial. *T. cruzi* tiene una enzima superóxido dismutasa (SOD) que es Fe dependiente, y además, necesita Fe para multiplicarse dentro de las células del hospedador⁽⁷⁾. En base a todo lo anterior, se planteó como objetivo de este trabajo, la búsqueda de actividad tripanocida en agentes quelantes de Fe, derivados de fenatrolina e imidazol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos ensayados

Los compuestos ensayados (Fig. 1) fueron sintetizados por el Dr. O. S. Adeyemi (Rhodes University, South Africa) y enviados al Departamento de Parasitología a través de la Dra. M.T. Molina, del Instituto de Química Médica (CSIC).

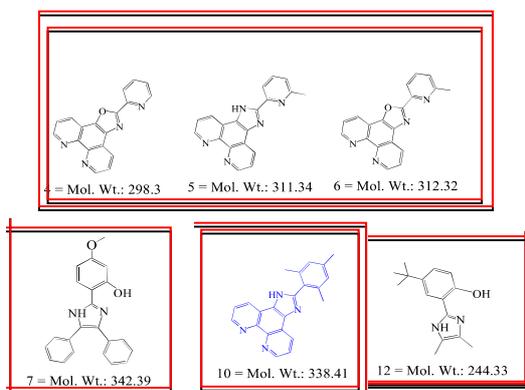


Figura 1. Estructura química y pesos moleculares de los compuestos ensayados.

Determinación de la actividad frente a epimastigotes de *T. cruzi*

Se ha utilizado la cepa CL de *T. cruzi*, transfectada con el gen de la β -galactosidasa de *Escherichia coli*, enzima que cataliza la reacción colorimétrica de reducción del sustrato CPRG (rojo de clorofenol β -D-galactopiranosido). Los parásitos se cultivan en medio LIT (infusión de hígado triptosa) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF) y antibióticos. Tras el recuento de epimastigotes fijados con

tintura de yodo en cámara de Neubauer, se siembran 250.000 epimastigotes/ml en cada uno de los pocillos de una placa de 96, siendo el volumen por pocillo de 200 μ l; se añaden 2 μ l /pocillo de los compuestos previamente disueltos en DMSO, disponiendo un total de tres pocillos por concentración y compuesto. Los ensayos se hicieron por duplicado. La concentración final de DMSO siempre fue inferior al 0,2%, concentración no tóxica para los parásitos. En cada placa se incluyeron seis pocillos de control de crecimiento (epimastigotes y LIT) y un pocillo de control de compuesto a ensayar para cada concentración (compuesto y LIT). Como fármaco de referencia se utilizó Benznidazol, proporcionado por el laboratorio Lafepe (Brasil). Las placas se incuban a 28°C durante 72 horas y transcurrido ese tiempo se adicionan 50 μ l del sustrato CPRG a cada pocillo y se incuban durante 3 horas a 37°C para que actúe la β -galactosidasa. A continuación se determinan las absorbancias, a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro de placas (ELx 800 de Bio-Tek instruments inc.), que serán proporcionales a la cantidad de parásitos de cada pocillo, y se calculan los porcentajes de actividad antiepigimastigote (%AE) según la siguiente fórmula:

$$\%AE = 100 - [(A_E - A_{EM}) / (A_C - A_M)] \times 100$$

de acuerdo a los valores medios de absorbancia de los pocillos experimentales (con parásitos, medio y compuestos - A_E), controles de compuestos y medio (A_{EM}), controles de crecimiento (A_C) y de medio (A_M).

Determinación de la citotoxicidad inespecífica

Para comprobar si la actividad antiepigimastigote es selectiva, se efectuaron pruebas de citotoxicidad inespecífica sobre células de mamíferos (fibroblastos murinos NCTC-929). Los fibroblastos se mantienen en frascos de cultivo celular, en MEM (Medio Mínimo Esencial) (Sigma) sin rojo-fenol, suplementado con 10% de SBF y antibióticos, en estufa de 37°C y 5% de CO₂. Para la realización de los ensayos se siembran placas de 96 pocillos, con 15.000 células/pocillo en 100 μ l de MEM, y tras 3 h de incubación, una vez adheridas al plástico, se retira el medio y se añaden 200 μ l de los compuestos en medio fresco. Se disponen tres pocillos por cada concentración, y los ensayos se hacen por duplicado. Se incluyen controles de crecimiento, medio y compuestos, y se incuban las placas 48 horas a 37°C y 5% de CO₂. A continuación se añaden 20 μ l/pocillo del indicador redox resazurina en PBS (2 mM, pH 7), y se vuelve a incubar 3 h. Después de la incubación introducimos la placa en un espectrofluorímetro (Tecan infinite 200) para determinar la intensidad de fluorescencia a 535 nm de excitación y 590 nm de emisión. Esta emisión de fluorescencia será proporcional al número de fibroblastos de mamífero vivos, determinándose el porcentaje de citotoxicidad (%C) por la fórmula:

$$\%C = 100 - [(IF_E - IF_{EM}) / (IF_C - IF_M)] \times 100$$

que representa los valores medios de intensidad de fluorescencia para cada compuesto (IF_E), compuestos en medio (IF_{EM}), controles de crecimiento (IF_C) y controles de medio (IF_M).

RESULTADOS

COMPUESTO	C (μM)	%AE ¹	CL ₅₀ (μM) ²	%C (929) ³	CL ₅₀ (μM) ⁴	IS ⁵
4	256	86,17	12,72	98,95	9,71	0,76
	128	79,76		90,89		
	64	79,29		77,33		
	32	74,60		72,96		
	16	54,66		65,32		
	8	43,30		45,82		
5	256	86,17	13,19	80,98	< 8	< 0,6
	128	79,76		76,76		
	64	79,29		73,15		
	32	74,60		72,34		
	16	54,66		66,19		
	8	43,30		66,76		
6	256	94,11	< 8	100	< 8	< 1
	128	84,73		99,74		
	64	80,93		92,96		
	32	79,36		86,30		
	16	78,19		73,45		
	8	72,44		59,79		
7	256	87,23	30,22	88,24	56,38	1,86
	128	79,13		93,92		
	64	83,84		59,83		
	32	72,21		18,52		
	16	28,03		7,76		
	8	14,64		0		
10	256	67,30	28,00	99,36	< 8	< 0,28
	128	85,35		99,36		
	64	84,10		99,63		
	32	55,65		96,57		
	16	33,04		65,95		
	8	9,87		72,52		
12	256	85,68	12,22	23,88	28,97	2,37
	128	81,39		29,67		
	64	80,13		52,56		
	32	79,76		54,59		
	16	74,60		30,35		
	8	22,60		5,66		
BZ	256	84,78	38,31	26,28	> 256	> 6,68
	128	78,45		4,80		
	64	66,80		1,11		
	32	45,87		1,51		
	16	29,62		1,10		
	8	8,32		0		

¹ Actividad tripanocida (media de dos experimentos independientes, la DS fue en todos los casos inferior a 10%). ² Concentración inhibitoria 50 (epimastigotes). ³ Citotoxicidad inespecífica en fibroblastos (media de dos experimentos independientes, la DS fue en todos los casos inferior a 10%). ⁴ Concentración letal 50 (fibroblastos). ⁵ Índice de selectividad (calculado como CL_{50}/IC_{50}).

Tabla 1. Actividad en epimastigotes y citotoxicidad inespecífica en fibroblastos murinos

DISCUSIÓN

Experimentos previos realizados con quelantes producidos por bacterias (*Streptomyces pilosus*), como la deferoxamina, y con derivados sintéticos de 1,10-fenantrolina sobre *T. brucei*⁽⁶⁾ han demostrado su potencial interés como nuevos tripanocidas. Basándonos en estos trabajos, nos pareció interesante realizar los ensayos de actividad frente a *T. cruzi*, de nuevos compuestos 1,10-fenantrolinas e imidazoles. La notable actividad antiepimastigote de las fenantrolinas (compuestos 4,5,6 y 10) es solo consecuencia de su citotoxicidad inespecífica. Sin embargo, los dos imidazoles (compuestos 7 y 12), con estructuras menos rígidas, han dado resultados más interesantes. Así, el compuesto 7 mantiene su actividad a una concentración que ya no es tóxica (32 μ M), y especialmente el 12, muestra una actividad más selectiva sobre epimastigotes, sobre todo a las concentraciones más altas, con índices de selectividad más próximos al fármaco de referencia benznidazol. La mayor libertad conformacional de estas dos moléculas, y en el 12, su menor lipofilia, pueden estar relacionados con la disminución de la toxicidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO (World Health Organization). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Geneva; 2010. 172 p.
2. Gascón J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. Acta Tropica. 2010; 115 (1-2): 22-27.
3. Urbina JA. Nuevas drogas para el tratamiento etiológico de la Enfermedad de Chagas. Mesa Debate. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, 2002.
4. McCann M, Kellett A, Kavanagh K, Devereux M, Santos ALS. Deciphering the Antimicrobial Activity of Phenanthroline Chelators. Current Medicinal Chemistry. 2012; 19 (17): 2703-2714.
5. Sall C, Yapi A-D, Desbois N, Chevalley S, Chezal J-M, Tan K, Telaude J-C, Valentin A, Blache Y. Design, synthesis, and biological activities of conformationally

restricted analogs of primaquine with a 1,10-phenantroline framework. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008; 18: 4666-4669.

6. Merschjohann K, Steverding D. *In vitro* growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense* by iron chelators. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 2006; 5(3).
7. Loo VG, Lalonde RG. Role of iron in intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* . 1984; 45 (3): 726-727.

Recibido: 7 noviembre 2013.

Aceptado: 24 febrero 2014.