

## Tratamiento

### LEISHMANIA

#### Utilidad de *Artemisia annua* como tratamiento en leishmaniasis cutánea, estudios *in vitro* e *in vivo*

Adriana María Restrepo<sup>1</sup>, Diana Lorena Muñoz<sup>1</sup>, Yulieth Alexandra Upegui<sup>1</sup>, Pierre Lutgen<sup>2</sup>, Iván Darío Vélez<sup>1</sup>, Sara María Robledo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> IFBV, Luxemburgo, Gran Ducado de Luxemburgo

**Introducción.** La planta *Artemisia annua* es de conocida actividad antipalúdica; reportes recientes demuestran su actividad anti-*Trypanosoma in vitro* y contra *Leishmania donovani*, *in vitro* e *in vivo*.

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad leishmanicida y la toxicidad de *A. annua in vitro* (*L. panamensis*) e *in vivo* (modelo *Leishmania amazonensis*/hámster).

**Materiales y métodos.** Las pruebas *in vitro* se practicaron con extracto crudo, tres fracciones y té; la citotoxicidad sobre células U-937 y la actividad sobre amastigotes axénicos e intracelulares, se estudiaron por MTT y citometría de flujo, respectivamente. Además, se inocularon hámsters dorados SPF formando cuatro grupos experimentales: té de *A. annua* (50 mg/kg y 100 mg/kg), Glucantime® (120 mg/kg) y control sin tratamiento. Se confirmaron la actividad y la toxicidad mediante seguimiento clínico durante cuatro meses y toma de muestras biológicas en diferentes tiempos.

**Resultados.** Aunque de escasa citotoxicidad, el té se consideró inactivo *in vitro*. La fracción uno tuvo actividad considerable, con baja toxicidad, en comparación con la anfotericina. En todos los grupos de animales se observó mejoría clínica de las lesiones, mayor con 50 mg/kg de *Artemisia*. La carga parasitaria mostró una disminución de hasta 99 % respecto al control. Ambas dosificaciones obtuvieron resultados positivos similares en improntas de piel y ganglio. La enfermedad no alteró significativamente los valores de la ALT, pero sí disminuyó la creatinina y aumentó el BUN; dichas alteraciones se agudizaron con los tratamientos al final del ensayo y, principalmente, con 100 mg/kg de *Artemisia*. No hubo pérdidas significativas de peso corporal en comparación con el Glucantime®.

**Conclusiones.** Se confirmó el efecto leishmanicida de *A. annua*. La fracción uno mostró mejor actividad y poca citotoxicidad, *in vitro*. *In vivo*, ambas concentraciones fueron efectivas e, incluso, superaron al Glucantime® en algunos parámetros, pero, con 50 mg/kg de *Artemisia* hubo menores efectos tóxicos sistémicos.

• • •

#### Efectos leishmanicidas *in vitro* e *in vivo* de compuestos tipo cromanos

Alejandro Daza<sup>1</sup>, Diana L. Muñoz<sup>1</sup>, Carol V. Mesa<sup>1</sup>, Anderson López<sup>1</sup>, Carolina Rios<sup>1</sup>, Winston Quiñones<sup>2</sup>, S. Roldán<sup>2</sup>, Gustavo Escobar<sup>2</sup>, Fernando Torres<sup>2</sup>, Iván D. Vélez<sup>1</sup>, Rosendo Archbold<sup>2</sup>, Fernando Echeverri<sup>2</sup>, Sara M. Robledo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Química Orgánica de Productos Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

**Introducción.** Los tipos de moléculas que tienen actividad contra parásitos son muy variados; no obstante, con alguna frecuencia la actividad se asocia con un sistema del tipo cromano-benzopirano presente en productos naturales. En búsqueda de nuevas sustancias leishmanicidas, se sintetizaron varios compuestos derivados de cromano, a fin de realizar estudios de estructura-actividad y obtener análogos más potentes que las sustancias originales.

**Materiales y métodos.** Los cromanos obtenidos por metodologías disponibles en literatura, se evaluaron *in vitro* para citotoxicidad en células U937 y macrófagos peritoneales de hámster y para actividad leishmanicida en amastigotes axénicos e intracelulares de *Leishmania panamensis* (cepa UA140 pirGFP), utilizando el micrométodo MTT para citotoxicidad y amastigotes axénicos y citometría de flujo para los intracelulares. Se calcularon la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) para citotoxicidad y la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) para actividad leishmanicida, por el método Probit. El índice de selectividad (IS) se calculó dividiendo la actividad citotóxica entre la actividad leishmanicida (IS = CL<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub>). Los estudios *in vivo* se hicieron en hámsters infectados experimentalmente con *Leishmania amazonensis* y tratados por vía tópica con cada compuesto sintetizado. Los hámsters se

revisaron semanalmente y cada 15 días se tomaron las mediciones correspondientes a peso y tamaño de la lesión.

**Resultados.** Los resultados *in vitro* mostraron actividad leishmanicida dependiente de la estructura, que se correlacionaron con la actividad *in vivo*, especialmente en cuanto a la cicatrización de la úlcera causada por el parásito, sin que se presentaran efectos toxicológicos secundarios.

**Conclusiones.** Los compuestos con actividad demostrada en el modelo animal poseen potencial para el desarrollo de un nuevo medicamento contra la leishmaniasis cutánea.

• • •

### Evaluación *in vivo* del ácido hipocloroso al 0,046 % como alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea en el modelo de hámster

Ánderson López<sup>1</sup>, Carolina Ríos<sup>1</sup>, Justo L. Calderón<sup>2</sup>, Alejandro Daza<sup>1</sup>, Carol Mesa<sup>1</sup>, Diana Muñoz<sup>1</sup>, Javier Murillo<sup>1</sup>, Andrés Tobón<sup>1</sup>, Iván D. Vélez<sup>1</sup>, Sara M. Robledo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Laboratorios AQUILABS S. A., Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** El ácido hipocloroso (HOCl), hace parte de un nuevo grupo de sustancias microbicidas conocidas como “moléculas antimicrobianas no antibióticas” que, por su amplio espectro, rápida acción y amplio margen de seguridad, puede ser utilizado para controlar y prevenir un amplio número de infecciones de piel y mucosas.

Fisiológicamente, el HOCl es producido por células del sistema inmunológico de los mamíferos, siendo los neutrófilos y macrófagos las principales células secretoras del HOCl utilizado para la destrucción de los microorganismos agresores. Las diferentes especies de *Leishmania* utilizan mecanismos para evadir la respuesta inmunitaria de su huésped, como es inhibir la activación del macrófago y evitar la producción de HOCl.

En este trabajo se pretende demostrar la actividad del HOCl, en hámsters infectados con *Leishmania amazonensis* y su potencial terapéutico.

**Materiales y métodos.** Se utilizó el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*); se infectaron experimentalmente con promastigotes de *L. amazonensis* en piel de dorso. Cuando la úlcera fue evidente, se inició el tratamiento de los animales según el esquema para cada grupo, de la siguiente

manera: solución acuosa formulación comercial (0,046 g%) y otras cuatro concentraciones: 0,092 g%, 0,184 g%, 0,23 g% y 0,46 g%. Además, cada concentración se evaluó en combinación con el Glucantime a fin de determinar el efecto sinérgico entre ambos compuestos. Éstos se evaluaron en cuanto a toxicidad y actividad leishmanicida.

**Resultados.** Se evidenciaron porcentajes de reducción de las lesiones que oscilaron entre 10 y 100 %, y una eficacia entre 17 y 100 %, que dependen de la concentración de HOCl, la vía de administración y la duración del tratamiento.

**Conclusiones.** El HOCl posee un potencial terapéutico para la leishmaniasis cutánea y, teniendo en cuenta que el producto ya cuenta con registro INVIMA, es importante continuar con estudios mediante ensayos clínicos controlados en humanos para conocer su utilidad y eficacia terapéutica.

• • •

### Evaluation of topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis with formulations containing pentamidine

Antonia Maria Ramos Franco<sup>1</sup>, Iryna Grafova<sup>2</sup>, Claudia Comandolli Wyrepkowski<sup>1</sup>, Andriy Grafov<sup>2</sup>, Alana Vinhote<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, Manaus, AM, Brasil

<sup>2</sup> Laboratory of Inorganic Chemistry, University of Helsinki, Helsinki, Finland

**Introduction.** Leishmaniasis is an endemic disease caused by species of genus *Leishmania*, characterized by skin lesions that can be cutaneous, muco-cutaneous or visceral. Transmission occurs when sand flies injected promastigote forms of *Leishmania* into mammalian hosts and *Leishmania* binds to macrophages and is quickly phagocytosed. Treatment of cutaneous leishmaniasis is difficult due to scarce number of drugs capable to eliminate completely the parasite intracellular form. It is realized with pentavalent antimonials or pentamidine isothionate. However, these drugs have various adverse effects: malaise, myalgia, headaches and changes in liver, kidney and pancreas. Additionally, patient may not respond to the treatment. For toxicity reason, PE may be applied for cutaneous leishmaniasis treatment as topical formulation directly over the lesions.

**Materials and methods.** Forty hamsters (*Mesocricetus auratus*) were infected with amastigote forms in snout and, after appearance

of the lesion nodules (23 days), the animals were divided into four groups and treated (2 applications, 8 days) with a cream containing 10% pentamidine isothionate, vegetable oil base and dibenzofurane compound from Nordic lichen (group 2), or with 10% pentamidine isothionate cream with the above base (group 3). Control animals were treated with cream containing only the oil base (group 1) or without cream administration (group 4).

**Results.** The aim of this work is evaluation of topical pentamidine isothionate treatment of experimental cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. A reduction of average lesions size and higher reduction rate after the end of treatment were observed for the Gr2. The lesion reduced at least 23% in 19 days. Treatment in the Gr2 resulted in minor activity, when compared to control hamster.

**Conclusions.** Treatment optimization and additional evaluations of topical treatment with pentamidine isothionate and the toxicity are in process mainly with this variety of *Leishmania* that has proved more resilient and more able to spread.

**Financial support.** INPA/ Academy of Finland, project N°133153

• • •

## Nuevos avances sobre la acción leishmanicida de lactonas sesquiterpénicas

Patricia Barrera<sup>1</sup>, Carlos Tonn<sup>1,2</sup>, Miguel Sosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Histología y Embriología-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Instituto de Ciencias Básicas-Universidad Nacional de Cuyo, Argentina

<sup>2</sup> Facultad de Química Bioquímica y Farmacia, INTEQUI-Universidad Nacional de San Luis, Argentina

**Introducción.** *Leishmania mexicana* causa leishmaniasis cutánea, y cumple su ciclo de vida entre amastigote intracelular (vertebrados) y promastigote extracelular (vector). Estos parásitos presentan glucoconjugados (gp63) sobre su superficie, como factores de virulencia, y la actividad de GDP-manosa pirofosforilasa (GDP-MP) es esencial para su síntesis.

Por otro lado, estos parásitos tienen un precario sistema defensivo contra ROS. Los compuestos leishmanicidas más efectivos son de limitado uso por su gran citotoxicidad. Hemos demostrado previamente que las lactonas sesquiterpénicas (STL) helenalina, mexicanina (Mxc) y dehidroleucodina (DhL), son activas sobre *L. mexicana*, afectando su crecimiento y viabilidad, e induciendo apoptosis.

La presencia de  $\alpha$ -metileno- $\beta$ -lactona, reactivo con grupos tioles, podría justificar una acción oxidativa de los compuestos y en este trabajo se ha tratado de investigar ese posible mecanismo.

**Métodos.** Se cultivaron promastigotes en medio Diamond (fase de proliferación), en presencia o ausencia de los compuestos. Se recolectaron alícuotas de los cultivos cada 24 horas y se estudió la proliferación y viabilidad de los parásitos, o se procesadas para estudios ultraestructurales. La expresión de factores de virulencia fue analizada por *Western blot* y, también, se evaluó la capacidad de infectar células de mamíferos. Para estudiar un posible efecto oxidante de las lactonas sesquiterpénicas, se hicieron ensayos en presencia de reductores (GSH) y se evaluó la producción de ROS con la sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA. Los datos fueron analizados por ANOVA/Dunnett o ANOVA / Bonferroni.

**Resultados.** Se corroboró que las lactonas sesquiterpénicas inhiben el crecimiento de los parásitos a bajas concentraciones y, en algunos casos, fue acompañado por alteraciones ultraestructurales. Las lactonas sesquiterpénicas afectaron la capacidad infecciosa de *L. mexicana*, posiblemente por alteración en la expresión de gp63 y GDP-MP. Se observó que GSH bloquea el efecto de las lactonas sesquiterpénicas, y dehidroleucodina aumentó significativamente la generación de ROS en los parásitos, mientras que el efecto de mexicanina fue leve.

**Conclusiones.** Las lactonas sesquiterpénicas actúan como leishmanicidas por múltiples efectos y se demostró que uno de los mecanismos es la generación de ROS en los parásitos.

• • •

## Medicamentos antiinflamatorios y cicatrizantes con potencial actividad leishmanicida

Carol V. Mesa<sup>1</sup>, Diana Muñoz<sup>1</sup>, Rodrigo Ochoa<sup>1</sup>, Carlos Muskus<sup>1</sup>, Iván D. Vélez<sup>1,2</sup>, Sara Robledo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

**Introducción.** En la actualidad sólo existen cuatro medicamentos para la leishmaniasis que son eficaces, pero presentan inconvenientes por su toxicidad, vía administración, duración del tratamiento y costos. En estudios recientes se ha demostrado que muchas de los fármacos empleados actualmente podrían tener otros

posibles blancos, aparentemente no relacionados a nivel de estructura o de secuencia. Por ende, la comparación de estructuras de fármacos se convierte en una estrategia útil para el hallazgo de nuevas actividades de medicamentos actuales. Las herramientas computacionales permiten la búsqueda rápida y efectiva para acelerar el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos con posible actividad leishmanicida.

En este proyecto nos propusimos identificar medicamentos con posible actividad leishmanicida, mediante aproximaciones bioinformáticas y su validación *in vitro* e *in vivo*.

**Materiales y métodos.** Se identificaron medicamentos con actividad antiinflamatoria y cicatrizante en formato SMILE provenientes de la base de datos DrugBank. A los medicamentos se les realizaron evaluaciones *in vitro* de citotoxicidad sobre la línea celular U-937, así como de actividad leishmanicida en amastigotes axénicos de *Leishmania panamensis* por MTT y sobre amastigotes intracelulares por citometría de flujo.

**Resultados.** Hasta el momento, se han identificado diez medicamentos que se usan en la actualidad como antiinflamatorios y cicatrizantes, a los cuales se les ha evaluado su actividad anti-*Leishmania in vitro*. Ocho de los medicamentos evaluados sobre la línea celular U937 fueron citotóxicos con valores de  $CL_{50}$  inferiores a 100  $\mu\text{g/ml}$ , exceptuando dos, que fueron medianamente citotóxico con valores de  $CL_{50}$  superiores a 100  $\mu\text{g/ml}$ . Tres de los medicamentos fueron muy activos en amastigotes axénicos, con valores de  $CE_{50}$  inferiores a 10  $\mu\text{g/ml}$ , y dos, para los amastigotes intracelulares.

**Conclusiones.** Con el presente trabajo hasta el momento hemos encontramos que cinco de los diez medicamentos seleccionados y evaluados tienen actividad biológica sobre *L. panamensis in vitro*, los cuales serán evaluados *in vivo*.



### Actividad leishmanicida de extractos de *Picramnia* spp. e *Inga* spp.

Claudia Asela<sup>1</sup>, Carol Mesa<sup>1</sup>, Wilson Cardona<sup>2</sup>, Jairo Sáez<sup>2</sup>, Diana Muñoz<sup>1</sup>, Fernando Alzate<sup>2</sup>, Iván D. Vélez<sup>1</sup>, Sara Robledo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Grupo Química de Plantas Colombianas, Instituto de Química, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

**Introducción.** La búsqueda de compuestos con potencial terapéutico continúa como una prioridad

para el manejo y control de la leishmaniasis en Colombia y el mundo. Los productos naturales son una gran fuente de moléculas y sustancias con potencial farmacológico que amerita ser explorada.

Varias especies de *Picramnia* spp. se han utilizado en la medicina tradicional por sus propiedades curativas. Esta especie de plantas se han caracterizado por tener metabolitos secundarios, como antraquinonas y flavonoides, los cuales han mostrado tener propiedades antimicrobianas. Igualmente, a varias especies de *Inga* spp. se les ha encontrado actividad biológica contra virus, hongos y bacterias.

Dada la necesidad de disponer de alternativas terapéuticas para la leishmaniosis y la utilidad de los productos naturales, en el presente trabajo se evaluó la citotoxicidad y la actividad leishmanicida *in vitro* de seis extractos de hojas y fruto, y un compuesto puro de *Picramnia* spp. pertenecientes a la familia Simaroubaceae, y siete extractos de las hojas del árbol leguminoso de *Inga* spp, perteneciente a la familia Mimosaceae.

**Materiales y métodos.** Las diferentes partes de las plantas fueron recolectadas, luego secadas, molidas, sometidas a extracción con solvente orgánicos y, posteriormente, usadas en las pruebas biológicas. A los extractos y el compuesto puro se les evaluó *in vitro* su citotoxicidad sobre la línea celular U-937, así como sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania panamensis* por citometría de flujo.

**Resultados.** De todos los compuestos evaluados, el que mostró la mejor actividad biológica fue el compuesto puro obtenido del fruto de *Picramnia* spp., con una  $CE_{50}$  de 17,0  $\mu\text{g/ml}$ ; además, no mostró citotoxicidad a una concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$ .

**Conclusiones.** Se observó actividad biológica sobre *L. panamensis* del compuesto puro obtenido de uno de los extractos evaluados, lo que les confiere un potencial como compuestos leishmanicidas.



### Miltefosine in the retreatment of pediatric cutaneous leishmaniasis that is non-responsive to meglumine antimoniate

Daniel Garcerant, Víctor Manuel Blanco, Javier Martínez, Luisa Consuelo Rubiano  
Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, Cali, Colombia

**Introduction.** Pentavalent antimony has been the first line treatment for cutaneous leishmaniasis

for over 60 years. Besides frequent side effects and consequent poor adherence, meglumine antimoniate has shown lower efficacy in children compared to adults. Currently recommended re-treatment includes repetition of meglumine antimoniate or administration of the more toxic pentamidine.

A recently completed randomized clinical trial of miltefosine in children in Colombia demonstrated efficacy of 83% Vs. 69% for meglumine antimoniate. This case series explores miltefosine for re-treatment when meglumine antimoniate therapy has failed.

**Methodology.** Consecutive pediatric patients who failed treatment with meglumine antimoniate—appearance of new lesions after initiation of treatment or incomplete re-epithelization at 3 month follow up— at the recommended dose of 20 mg/kg/day for 20 days, were administered oral miltefosine at the standard dose of 1.8 to 2.5 mg/kg/day for 28 days. Treatment response was followed for 6 months.

**Results.** Six children aged 4 to 8 years with cutaneous leishmaniasis were included in this case series. *Leishmania panamensis* was isolated from 5 cases. Median number of lesions was 2 (range, 1-4). Cure, defined as complete re-epithelization of all lesions, absence of raised borders, erythema and satellite lesion, was achieved at the end of treatment in 5 children and at 13 weeks following initiation of treatment in one child. Side effects did not impede adherence to treatment. No recurrence of disease occurred during the 6 month follow up.

**Conclusions.** The outcome of retreatment with miltefosine in this case series encourages the use of this medication for pediatric CL when treatment with meglumine antimoniate has failed. The efficacy, oral administration, low toxicity, and the fact that contraception is not needed for the administration of miltefosine in children below reproductive age, support miltefosine as an effective therapeutic alternative.

Supported by Fogarty International Center, US National Institutes of Health contrato1 D43 TW006589; COLCIENCIAS, contract: 363-2006.

• • •

### Actividad antiparasitaria de bromotirosinas aisladas de una esponja marina colombiana

Diana Muñoz<sup>1</sup>, Carol Mesa<sup>1</sup>, Elkin Galeano<sup>2</sup>, Yulieth Upegui<sup>1</sup>, Olivier P. Thomas<sup>3</sup>, Sara Robledo<sup>1</sup>, Iván D. Vélez<sup>1</sup>, Alejandro Martínez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Investigación Productos Naturales Marinos, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>3</sup> Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes, Université de Nice-Sophia Antipolis, Parc Valrose, France

**Introducción.** En el golfo de Urabá, se encuentra una gran variedad de esponjas marinas, a las cuales actualmente se les está investigando la composición química en busca de compuestos con actividad farmacéutica. Entre éstas, se encuentra la esponja *Verongula rigida* que, como otras especies del orden Verongida, es de interés biológico y químico y se caracteriza por la elaboración de metabolitos bromados que son relacionados con la tirosina. Extractos y compuestos de varias especies de ese género han mostrado tener actividad antimicrobiana, citotóxica y antiparasitaria.

En el presente trabajo, a once bromotirosinas (1-11) aisladas de la esponja *Verongula rigida* recolectada en el Golfo de Urabá, se les evaluó su actividad antiplasmódica, leishmanicida, tripanocida y citotóxica.

**Materiales y métodos.** A los compuestos se les realizaron evaluaciones *in vitro* de inhibición sobre la línea celular U-937, así como de inhibición de la actividad leishmanicida en amastigotes axénicos e intracelulares de *Leishmania panamensis* por MTT para los axénicos y citometría de flujo para los intracelulares; además, se hicieron evaluaciones sobre *Plasmodium falciparum* por fluorometría, tiñendo el ADN con BrEt, y sobre *T.cruzi* cepa Tulahuen, que expresa el gen de la  $\beta$ -galactosidasa por colorimetría.

**Resultados.** De los compuestos evaluados, los que mostraron la mejor actividad biológica fueron el compuesto 10 que mostró 12,6 % de inhibición sobre amastigotes de *Leishmania* a 10  $\mu$ M y no mostró tener citotoxicidad a 20  $\mu$ M; igualmente, se observó que el compuesto 9 presentó 23,2 % de inhibición de sobre *P. falciparum* a 5 $\mu$ M y no mostró actividad citotóxica a 20  $\mu$ M.

**Conclusiones.** Con el presente trabajo se logró encontrar dos compuestos selectivamente bioactivos *in vitro* contra los parásitos *L. panamensis* y *P. falciparum*, lo que les confiere un potencial como compuestos leishmanicidas y antipalúdicos promisorios.

• • •

## Caracterización molecular y bioquímica de las cinasas de colina y etanolamina de *Leishmania braziliensis* como un nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de la leishmaniosis

María Fernanda Flórez, Sergio Pulido, Sara M. Robledo  
Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Colombia

**Introducción.** La leishmaniosis abarca un grupo de enfermedades que afectan a millones de personas en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Las presentaciones clínicas como la leishmaniosis cutánea y mucosa, se asocian con la infección por la especie *Leishmania braziliensis*. Los medicamentos actuales para el tratamiento de la enfermedad presentan inconvenientes por toxicidad, costo y desarrollo de resistencia en el parásito; por esto, es necesario encontrar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad y nuevos blancos terapéuticos para el desarrollo racional de nuevos compuestos leishmanicidas. Los lípidos de membrana como la fosfatidilcolina y su metabolismo en el parásito, prometen ser un excelente blanco terapéutico por su importancia en la función celular; sin embargo, la información disponible al respecto es escasa. La cinasa de colina es la primera enzima en la principal ruta de obtención de fosfatidilcolina en eucariotas; no obstante, no existe comprobación experimental de la misma en *L. braziliensis*.

**Materiales y métodos.** Se aisló y se clonó el gen de la cinasa de colina de *L. braziliensis*, la cual fue expresada en un sistema procariota y se purificó para hacer análisis bioquímicos enzimáticos y determinar el efecto inhibitorio de compuestos sintéticos análogos de la colina.

**Resultados.** Se presenta la descripción molecular y bioquímica de la cinasa de colina de *L. braziliensis* y se propone como un nuevo blanco terapéutico. Además, se muestra que la actividad de la enzima se modula por medio de compuestos sintéticos análogos de la colina, los cuales presentan actividad leishmanicida en ensayos *in vitro*.

**Conclusiones.** Este hallazgo soporta la hipótesis de que la cinasa de colina de *L. braziliensis* sería un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea o mucosa. Sin embargo, es necesario realizar experimentos adicionales para determinar la importancia biológica de la enzima en el parásito.

## Desarrollo de un ensayo prototipo para la evaluación de sensibilidad *in vitro* a medicamentos de cepas clínicas de *Leishmania sp.* mediante el 7SLRNA

Paula Castañeda, Olga Fernández, María Adelaida Gómez, Nancy Saravia  
Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, Cali, Colombia

**Introducción.** Las especies de *Leishmania* muestran una variación significativa en la sensibilidad a medicamentos. Las metodologías *in vitro* utilizadas para la evaluación de la sensibilidad a medicamentos dependen de la evaluación microscópica de la infección con base en amastigotes intracelulares. El objetivo principal de este estudio es desarrollar una prueba prototipo para la evaluación de sensibilidad *in vitro* de *Leishmania*, basado en la detección del blanco molecular 7SLRNA.

**Materiales y métodos.** Se determinó la sensibilidad a Glucantime® y miltefosina por RT-qPCR, amplificando la molécula 7SLRNA como marcador de viabilidad en 16 cepas clínicas de *Leishmania (Viannia) panamensis* clasificadas previamente por evaluación microscópica como sensibles (n=5) y resistentes (n=4) a Glucantime®, y sensibles (n=2) y resistentes (n=5) a miltefosina. Además, la capacidad de la prueba para identificar parásitos viables se relacionó con la actividad luciferasa de amastigotes intracelulares transfectados con el gen *Luc* en un ensayo dosis-respuesta de Glucantime® y miltefosina. Los resultados obtenidos por RT-qPCR fueron normalizados con un gen constitutivo (*tata box binding protein*) de la célula huésped. Los valores de ED50 se establecieron por medio del programa ICEstimator y la clasificación categórica de sensibilidad se hizo mediante una metodología de tamización, donde la supervivencia de amastigotes intracelulares mayor o igual a 50 % se define como resistencia y la menor de 50 % como sensibilidad. Los resultados se compararon con los obtenidos por microscopía.

**Resultados.** Los valores de ED50 obtenidos para Glucantime® y miltefosina con base en la cuantificación de moléculas de 7SLRNA como medida de viabilidad de los parásitos intracelulares, muestran una correlación de 99 % con los ED50 obtenidos en el ensayo de luciferasa ( $p < 0,001$ ). En un ensayo de tamización de sensibilidad a Glucantime® y miltefosina en 16 cepas clínicas de *L. panamensis*, se encontró una correlación de 94 % en el porcentaje de reducción de parásitos obtenidos mediante RT-qPCR y microscopía.

( $p < 0,001$ ), lo cual permitió su clasificación como sensibles o resistentes a los dos medicamentos.

**Conclusiones.** Hemos desarrollado una herramienta molecular basada en la amplificación de la molécula 7SLRNA para el seguimiento de la pérdida de sensibilidad a medicamentos en cepas clínicas de *L. Viannia*. La aplicación de este prototipo molecular permitirá conocer la sensibilidad a los

medicamentos actualmente empleados de manera rápida y confiable, comparada con otros métodos *in vitro*.

**Financiación.** Colciencias convenio 797-2009, NIH/Fogarty contrato D-43TW006859 y NIH/NAID contrato U19AI065866

