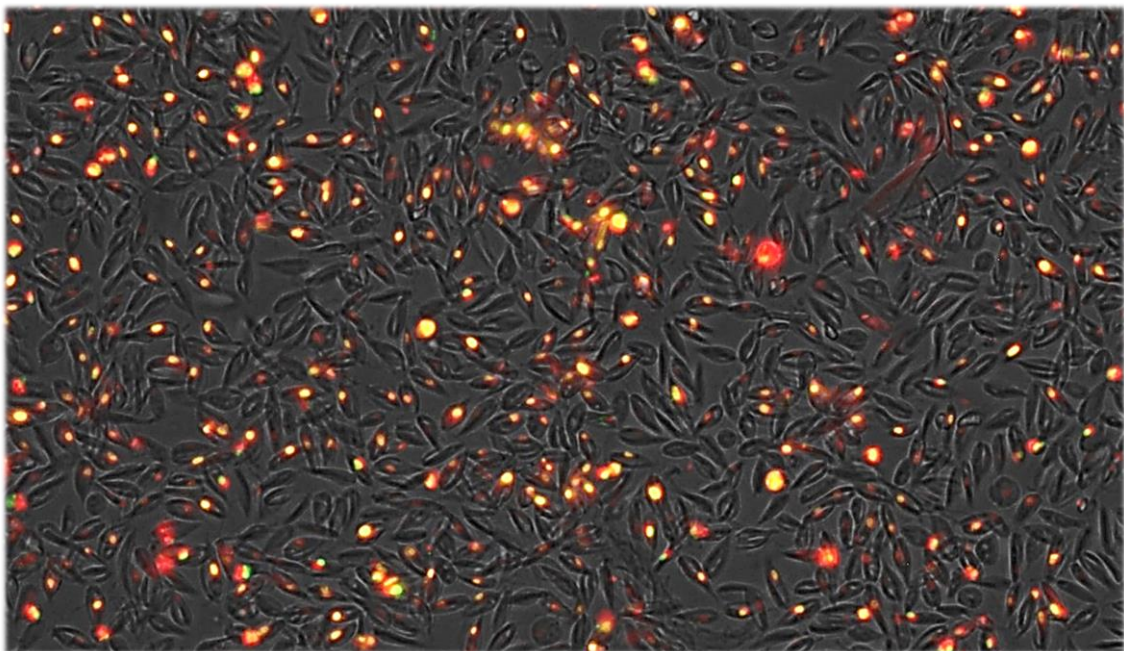


# Actividad de productos de origen natural frente a Kinetoplástidos

Trabajo de Fin de Grado



Román Pino Vera

## Tutores:

Dr. José Enrique Piñero Barroso

Dra. Atteneri López Arencibia

Área de Parasitología

Grado en Farmacia

Junio 2019

## Índice

Listado de abreviaturas.....	1
Resumen.....	2
Introducción.....	3
Leishmaniosis.....	3
Enfermedad de Chagas .....	5
Objetivos .....	8
Material y métodos.....	9
Resultados y discusión.....	11
Ensayos de actividad y citotoxicidad.....	11
Mecanismos de acción sobre <i>Leishmania</i> .....	13
Conclusiones.....	17
Bibliografía.....	18

## Listado de abreviaturas:

**NTDs.** Neglected Tropical Diseases.

**LV.** Leishmaniosis Visceral.

**LC.** Leishmaniosis Cutánea.

**LM.** Leishmaniosis Muco-cutánea.

**DMEN.** Dulbecco's Modified Eagle Medium.

**LIT.** Liver Infusion Tryptose.

**RPMI.** Roswell Park Memorial Institute.

**SBFI.** Suero bovino fetal inactivado.

**ADN.** Ácido desoxirribonucleico.

**CI<sub>50</sub>.** Concentración inhibitoria 50.

**CI<sub>90</sub>.** Concentración inhibitoria 90.

**ATP.** Adenosina trifosfato.

## Resumen:

Los tratamientos de elección para la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas han sido los mismos durante más de 50 años, presentando problemas de toxicidad y eficacia cada vez mayores; sin contar con la dificultad añadida del acceso de la población afectada a los mismos. Estas enfermedades, causadas por protozoos parásitos, afectan a millones de personas alrededor del mundo con cuadros clínicos muy variables y potencialmente mortales. Consideradas como enfermedades tropicales desatendidas por la Organización Mundial de la Salud, por pasar inadvertidas tanto para la sociedad como para la comunidad científica, requieren urgentemente de la investigación de nuevos principios activos para combatirlos. En este estudio se ha realizado un fraccionamiento bioguiado de *Streptomyces sanyensis*, con el fin de obtener moléculas con buena actividad leishmanicida y tripanocida y baja toxicidad, con relación a los fármacos de referencia.

Palabras clave: Leishmaniosis, enfermedad de Chagas, tratamiento, quimioterapia, *Streptomyces sanyensis*.

## Abstract:

The treatment of choice for leishmaniosis and Chagas disease had been the same one for more than 50 years, which presents growing ineffectiveness and toxicity problems; not counting the trouble of the affected population to get it. These illnesses, caused by parasitic protozoa, harm millions of people worldwide with different and potentially deadly clinical manifestations. Considered as neglected tropical diseases by the World Health Organization because of being unnoticed for society and scientific community, they require urgent researches on new drugs to fight them. In this study a biomass extract of *Streptomyces sanyensis* has been fractionated and tried in order to obtain molecules with better antileishmanial and antitrypanosomal activities and lower toxic effects than the current treatments.

Keywords: Leishmaniasis, Chagas disease, treatment, chemotherapy, *Streptomyces sanyensis*.

## Introducción:

Las enfermedades causadas por parásitos afectan a millones de personas en todo el mundo, especialmente en las zonas tropicales, cuyas condiciones climatológicas favorecen el desarrollo de estos organismos<sup>1</sup>. Dentro de los protozoos parásitos, la clase *kinetoplastida* (caracterizada por la presencia de un orgánulo, denominado kinetoplasto, con miles de moléculas de ADN circular en su interior) comprende los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*, causantes frecuentes de infecciones de diversa patología<sup>2</sup>.

Tanto la leishmaniosis como la tripanosomosis (africana y americana) forman parte de las enfermedades tropicales olvidadas (Neglected Tropical Diseases, NTDs), enfermedades infecciosas mayoritariamente parásitas, relacionadas con la pobreza, los climas cálidos y el escaso respaldo de la comunidad internacional en cuanto a control e investigación<sup>3,4</sup>. Debido a la limitada cantidad de recursos destinados a estas dolencias y, sobre todo, por la escasa variedad de fármacos que existen para tratarlas, los cuales además presentan toxicidad y resistencias cada vez mayores, se hace necesaria la búsqueda de nuevos principios activos con actividad antiprotozoaria.

## Leishmaniosis:

La leishmaniosis es una enfermedad vectorial que cursa con diferente sintomatología según la especie responsable de la infección. Históricamente se han distinguido dos zonas: la leishmaniosis del viejo mundo, transmitida por vectores del género *Phlebotomus*, en los países de la cuenca del Mediterráneo, África, Oriente Medio y Asia; y la leishmaniosis del nuevo mundo, transmitida por vectores del género *Lutzomyia*, en Sudamérica, América central y el sur de Estados Unidos<sup>5</sup>.

Zona geográfica	Clínica predominante	Especie
Asia (India, Bangladesh, Nepal)	LV	<i>L. donovani</i>
Este de África (Sudán, Etiopía, Kenia, Uganda, Somalia)	LV	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>
Cuenca del Mediterráneo, Oriente medio y Sudeste asiático	LV	<i>L. infantum</i>
Brasil	LV	<i>L. infantum</i>
Oriente Medio hasta Afganistán, partes del norte y este de África	LC	<i>L. tropica</i>
Norte de África, Asia central y occidental	LC	<i>L. major</i>
Perú y Ecuador	LC	<i>L. peruviana</i>
Norte de Suramérica	LC	<i>L. guyanensis</i>
América Central y Suramérica (desde Honduras a Ecuador)	LC, LM	<i>L. panamensis</i>
América latina (desde México a Argentina)	LC, LM	<i>L. braziliensis</i>
Desde el sur de Texas a Bolivia	LC	<i>L. mexicana</i>

Tabla 1. Distribución de las especies de leishmania (LV, leishmania visceral; LC, leishmania cutánea; LM, leishmania muco-cutánea)<sup>6</sup>.

Tras la picadura del insecto, la forma infectiva del parásito (promastigote metacíclico) a nivel cutáneo, se introduce en los macrófagos cercanos y se transforma en su forma intracelular (amastigote). En el citoplasma los parásitos se mantienen en una vacuola parasitófora y comienzan a multiplicarse por fisión binaria. Tras varios ciclos de división los parásitos se liberan rompiendo la membrana del macrófago y se dirigen a infectar otras células del sistema fagocítico mononuclear. Los parásitos se pueden diseminar por el organismo, dentro de las células que los hospedan, haciendo uso del sistema circulatorio. El ciclo se cierra cuando el flebótomo se alimenta de sangre infectada, en cuyo interior los parásitos retornan a la forma promastigote y llevan a cabo su ciclo a nivel del tubo digestivo y glándulas salivares <sup>7</sup>.

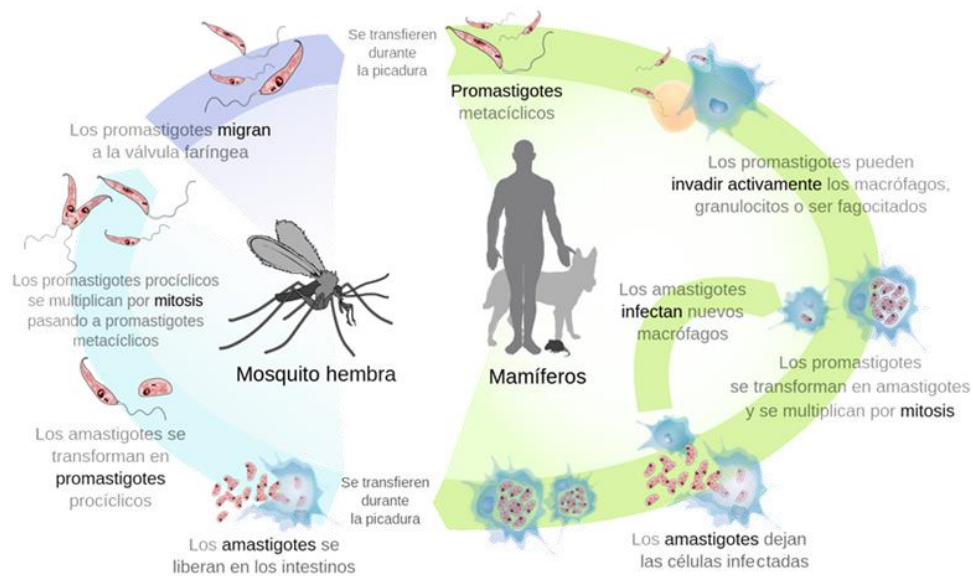


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania*<sup>8</sup>.

Tanto la especie de *Leishmania* involucrada como el estado de salud del hospedador serán determinantes para los síntomas que generen, así como para la gravedad de estos<sup>7</sup>, distinguiéndose principalmente tres patologías diferentes:

- Leishmaniosis cutánea: la forma más común de la enfermedad, tras la picadura del vector aparecen lesiones en la piel al cabo de unas semanas. Estas comienzan como pequeñas pápulas que van aumentando de tamaño hasta dar lugar a las características úlceras “en forma de volcán” con los bordes elevados. Esta patología suele remitir de manera espontánea tras unos meses<sup>9</sup>.
- Leishmaniosis visceral (kala-azar): es la forma más severa de la infección, con una tasa de mortalidad muy elevada si no es tratada. Tras la primera multiplicación en los macrófagos el parásito migra a diversos órganos, sobre todo hígado y bazo; provocando fiebre, pérdida de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, y pancitopenia, con posibles hemorragias o infecciones secundarias<sup>9</sup>.



- Leishmaniosis mucocutánea: es poco frecuente y puede aparecer como una secuela de la afección cutánea meses después de la curación. Destruye estructuras mucosas, como el paladar o el tabique nasal y, en algunos casos, puede provocar leishmaniosis diseminada con la proliferación de nódulos por toda la piel<sup>9</sup>.



Figura 2. De izquierda a derecha: úlcera seca por leishmaniosis cutánea; hepato y esplenomegalia por leishmaniosis visceral; daño en tabique nasal por leishmaniosis mucocutánea<sup>10,11</sup>.

Los primeros fármacos usados contra *Leishmania* fueron derivados del antimonio, como el estibogluconato sódico en la década de 1920. Debido a su toxicidad, estos compuestos poseen un margen terapéutico estrecho, aunque se siguen utilizando en algunas zonas donde aún presentan eficacia aceptable. Otras moléculas utilizadas son la miltefosina o la paromomicina, más seguras, pero con un espectro de acción más corto. Por último, el compuesto con mejor efectividad hasta la fecha ha sido la anfotericina B, la cual se administra en forma liposomal para disminuir su toxicidad. Aun así, los niveles de fracaso terapéutico siguen siendo llamativos debido a la aparición de resistencias de los parásitos, el estado del hospedador o la capacidad del fármaco para llegar hasta el lugar de acción<sup>12</sup>.

### Enfermedad de Chagas:

La enfermedad de Chagas está causada por *Trypanosoma cruzi* y, en este caso, es transmitida por chinches de la familia *Reduviidae* (géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*). La gran mayoría de las infecciones causadas por este parásito ocurren en el continente americano, al ser el hábitat natural del vector, especialmente en las zonas rurales situadas entre los trópicos. Fuera de estas fronteras se han notificado casos de transmisión no vectorial: por vía vertical de madre a hijo, transfusional por contacto con sangre infectada o por trasplante de órganos<sup>13</sup>.

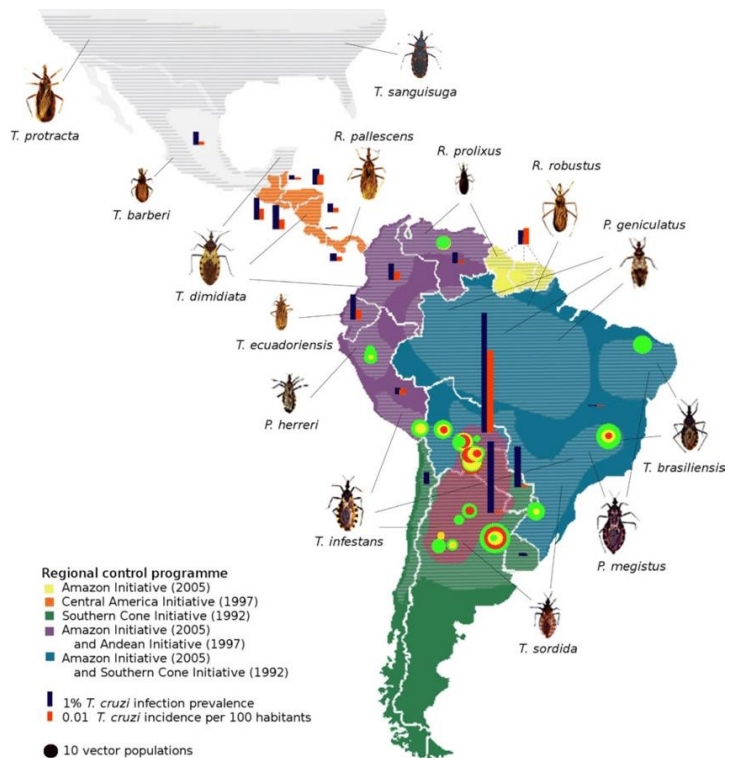


Figura 3. Distribución de los vectores de *T. cruzi*<sup>14</sup>.

Cuando la chinche pica a un hospedador vertebrado para alimentarse de sangre a su vez también expulsa las formas infectivas del parásito (tripomastigotes metacíclicos) por las heces, que entran al torrente sanguíneo por la herida provocada. Una vez en este hospedador los protozoos invaden las células del sistema fagocítico-mononuclear cercanas y se diferencian a amastigotes, para posteriormente multiplicarse por fisión binaria. Tras varios ciclos de división vuelven a transformarse en tripomastigotes, que son liberados tras lisis la célula hospedadora, para volver a infectar otras células del organismo. Cuando la chinche se alimenta puede adquirir con la sangre tripomastigotes circulantes, estos se transforman en epimastigotes y se multiplican en su sistema digestivo para finalmente convertirse de nuevo en tripomastigotes metacíclicos, cerrando así el ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*<sup>1</sup>.

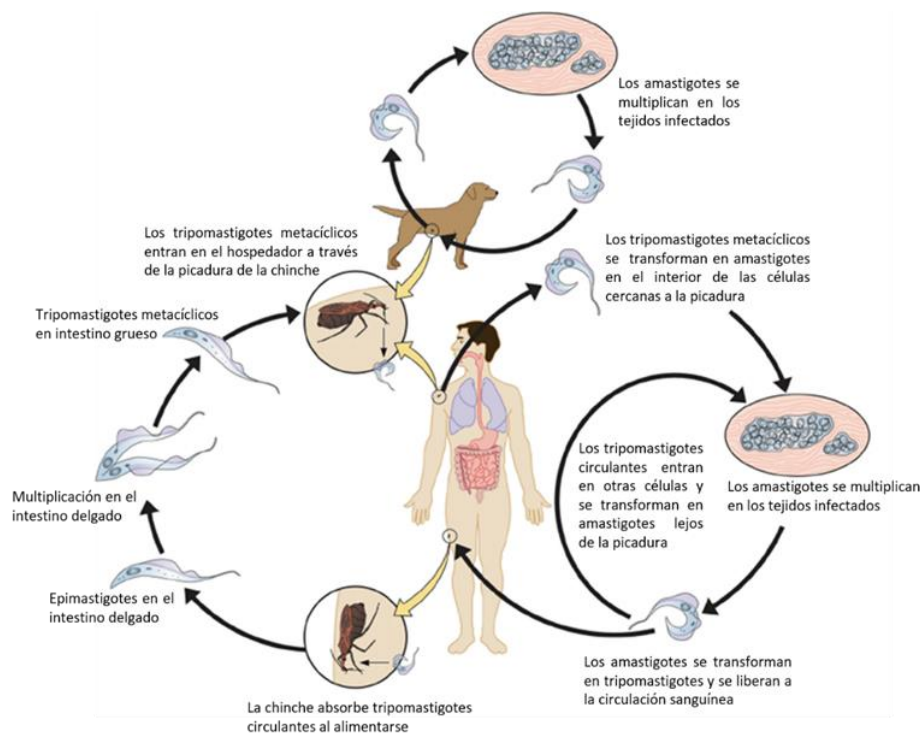


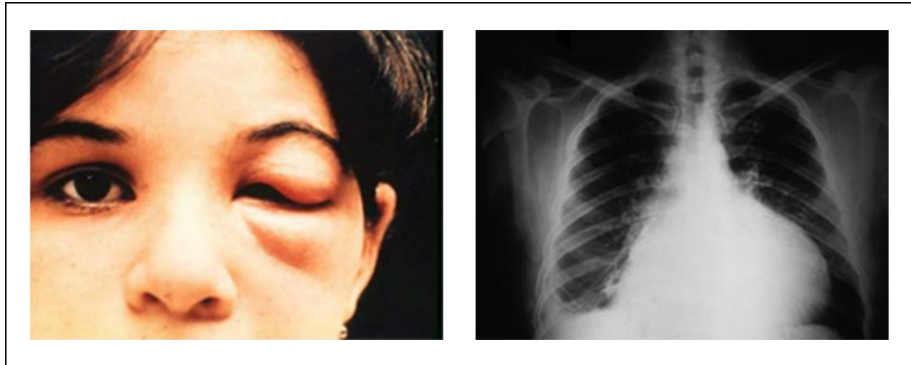
Figura 4. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (adaptado)<sup>16</sup>.

En cuanto a la patología del Chagas podemos distinguir dos fases de la enfermedad con diferente sintomatología:

- Fase aguda: caracterizada por la presencia del parásito en sangre periférica, la gran mayoría de los casos son asintomáticos por lo que muy pocos son identificados en esta fase<sup>12</sup>. Es típica la inflamación y edema en la zona de la picadura del vector, especialmente cerca de los ojos, conocida como signo de Romaña<sup>15</sup>. Otros síntomas son: fiebre, dolor en articulaciones y musculatura, insuficiencia respiratoria, miocarditis o meningoencefalitis. A pesar de todas estas complicaciones, la mayoría de los casos remiten de manera espontánea<sup>13</sup>.



- Fase crónica: independientemente de que en la fase aguda haya manifestado síntomas o no, la infección desarrollará una fase posterior que puede manifestarse a cualquier edad y sin distinción entre sexos, siendo más frecuente en pacientes situados entre los 30 y 45 años. Aproximadamente un tercio de la población infectada presenta afecciones cardiovasculares que causan la muerte por insuficiencia cardíaca o arritmia entre los 7 meses y 2 años siguientes a la aparición de los síntomas; también se puede presentar inflamación masiva de las vísceras con megaesófago o megacolon, junto con alteraciones en los nervios periféricos<sup>13</sup>.



*Figura 5. De izquierda a derecha: signo de Romaña en la zona de picadura de la chinche vector de la enfermedad de Chagas; inflamación del corazón por enfermedad de Chagas crónica<sup>18,19</sup>.*

Actualmente solo existen dos fármacos para el tratamiento de la tripanosomiasis americana: nifurtimox y benznidazol, sustancias nitroderivadas que liberan radicales libres tóxicos para el parásito y, en menor medida, para las propias células del hospedador<sup>13</sup>. La quimioterapia debe ser administrada tan rápido como se diagnostique la enfermedad, ya que su eficacia está probada para la fase aguda. En los casos de enfermedad de Chagas crónica debe valorarse la administración de la medicación para retrasar o prevenir la aparición de síntomas frente a su toxicidad a largo plazo<sup>20</sup>.

## Objetivos:

1. Ensayar *in vitro* la actividad antiparasitaria de nuevos principios activos sobre distintas especies de *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi*.
2. Realizar estudios de citotoxicidad en las moléculas más activas y determinar su índice de selectividad.
3. Evaluar los mecanismos de acción de las moléculas ensayadas.

## Material y métodos:

Software SigmaPlot y Microsoft Excel para el análisis de los datos

Fracciones del extracto *Streptomyces sanyensis* (PBLC-04)

*Trypanosoma cruzi* cepa Y, incubadas en medio Liver Infusion Tryptose (LIT)

*Leishmania donovani* cepa MHOM/IN/1983/AG83

*Leishmania amazonensis* cepa MHOM/BR/77/LTB0016

Macrófagos murinos J774A.1 cepa ATCC # TIB-67 en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Medio RPMI 1640 sin rojo fenol (*Gibco Life Technologies*) con suplemento del 10% de SBF1 y gentamicina 10 µg/ml para el cultivo de *Leishmania spp*

**1.- Ensayos de actividad.** Para los ensayos de actividad y citotoxicidad se usó el alamarBlue, un preparado comercial a base de resazurina que permite estudiar la viabilidad celular, al ser capaz de reducirse en presencia de actividad biológica dando una señal de fluorescencia medible y cuantificable por un espectrofotómetro<sup>21</sup>.

**Ensayo de actividad frente a promastigotes/epimastigotes:** En las placas multipocillo se prepararon diluciones seriadas de cada compuesto a ensayar en los medios de cultivo indicados para cada especie, dejando tres pocillos solo con medio como control negativo, para luego añadir un determinado número de parásitos ( $10^6$  cel/mL para *Leishmania* y  $2 \times 10^5$  cel/mL para *Trypanosoma*), finalmente se añadió alamarBlue al 20% y se incubó durante 72 horas a 26°C. Pasado este tiempo se midió la fluorescencia con el lector de placas EnSpire (Perkin Elmer) (excitación 570nm/emisión 585nm).

La concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) expresa la dosis de principio activo, en unidades de concentración (µg/ml), que reduce a la mitad el crecimiento de los parásitos con respecto a la muestra control. El cálculo se realiza mediante la representación gráfica de los datos de fluorescencia, obtenidos por el lector de placas, frente a la concentración de extracto de cada pocillo. Los puntos se ajustaron a una ecuación de curva estándar de cuatro parámetros que nos permite obtener el valor de  $CI_{50}$ . Para ello, se procesaron los datos en el programa Excel, se elaboraron las gráficas y se calcularon las ecuaciones con el programa SigmaPlot versión 12.0.

**Ensayos de actividad en amastigotes intracelulares (*Leishmania amazonensis*):** Estos ensayos requirieron infectar macrófagos con los parásitos, para ello se colocaron los macrófagos en placas multipocillos a una concentración de  $2 \times 10^5$  cel/mL. Una vez adheridos al fondo del pocillo se añadían los promastigotes infectivos en su fase metacíclica (5-6 días tras el último cambio de medio) en una proporción 1:10 (macrófagos:promastigotes) y se incubaron hasta el día siguiente a 37°C y 5% de  $CO_2$ . Pasado ese tiempo se lavaron los pocillos para eliminar los parásitos no internalizados. A continuación, se añadieron los principios activos a diferentes concentraciones, dejando también pocillos sin tratamiento como controles negativos, para posteriormente incubarse 24 horas bajo las mismas condiciones.

Para terminar, se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se añadieron 30 µL de SDS al 0,05%, mientras se agitaba la placa durante 30 segundos con el fin de romper las membranas plasmáticas de los macrófagos y liberar a los parásitos al medio. Seguidamente se añadieron 170 µL de medio de cultivo y se incubaron las placas en la estufa a 26°C durante 72 horas para

favorecer el paso de los amastigotes a promastigotes. Una vez transcurrido ese tiempo, se le adicionó alamarBlue y se realizaron las medidas de fluorescencia en el lector de placas.

**2.- Ensayos de citotoxicidad.** Los compuestos puros aislados que presentaron actividad antiparasitaria fueron incubados junto a macrófagos a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>, igualmente se utilizó el alamarBlue para la determinación de la concentración citotóxica 50. A partir de estos datos y la CI<sub>50</sub> se obtuvieron los índices de selectividad de cada compuesto (CC<sub>50</sub>/ CI<sub>50</sub>).

**3.- Mecanismos de acción sobre los parásitos.** Por otro lado, los compuestos más interesantes fueron sometidos a la evaluación de sus mecanismos de acción sobre las células de los parásitos:

**Análisis del potencial de membrana mitocondrial:** Para este estudio se utilizó el JC-1, un colorante que, en condiciones normales, se acumula en el interior mitocondrial formando agregados que emiten a 595nm (rojo), en cambio, si el potencial de membrana disminuye, la sonda quedara dispersa en el citoplasma en forma monomérica emitiendo a 535nm (verde). La ratio de emisión de fluorescencia 595/535 (rojo/verde) indica el grado de polarización de las mitocondrias en un cultivo celular. Los parásitos se incubaron con las CI<sub>90</sub> de los principios activos durante 24 horas para luego lavarse e incubarse en buffer con JC-1 unos 15 minutos en oscuridad. Finalmente, se realizaron las lecturas de fluorescencia en un lector de placas, así como la observación a microscopio EVOS FL II (Invitrogen).

**Análisis de la permeabilidad de la membrana plasmática:** Para este ensayo se utilizó el Sytox Green (Invitrogen), un fluoróforo que penetra únicamente en células cuya membrana plasmática se encuentre comprometida y multiplica su fluorescencia en más de 500 veces al adherirse al ADN (excitación 504nm/emisión 523nm). Los parásitos se incubaron con las CI<sub>90</sub> para, tras 24 h, ser incubados con el fluoróforo protegiéndose de la luz y ser observados a microscopio.

**Análisis de condensación de la cromatina:** Para la detección de cromatina condensada se utilizó un kit comercial, *Chromatin Condensation/Cell Death Apoptosis Kit* (Invitrogen), que utiliza Hoechst, un fluoróforo que tiñe de azul más intensamente la cromatina condensada en células apoptóticas que la de células sanas, y el yoduro de propidio, que sólo es capaz de penetrar en células muertas. El ensayo se realizó incubando a los parásitos con los principios activos a su CI<sub>90</sub> y observándose a microscopio de fluorescencia.

## Resultados y discusión:

### 1.- Ensayos de actividad y citotoxicidad:

Las fracciones y compuestos ensayados fueron obtenidos a partir del extracto crudo de *Streptomyces sanyensis* proveniente de Ecuador y cultivado en la Universidad de La Laguna, identificado como PBLC-04. Las fracciones obtenidas de la biomasa de este extracto fueron sometidas a un cribado con el fin de separar las más activas para continuar con ensayos posteriores (fraccionamiento bioguiado), hasta la obtención de tres compuestos puros.

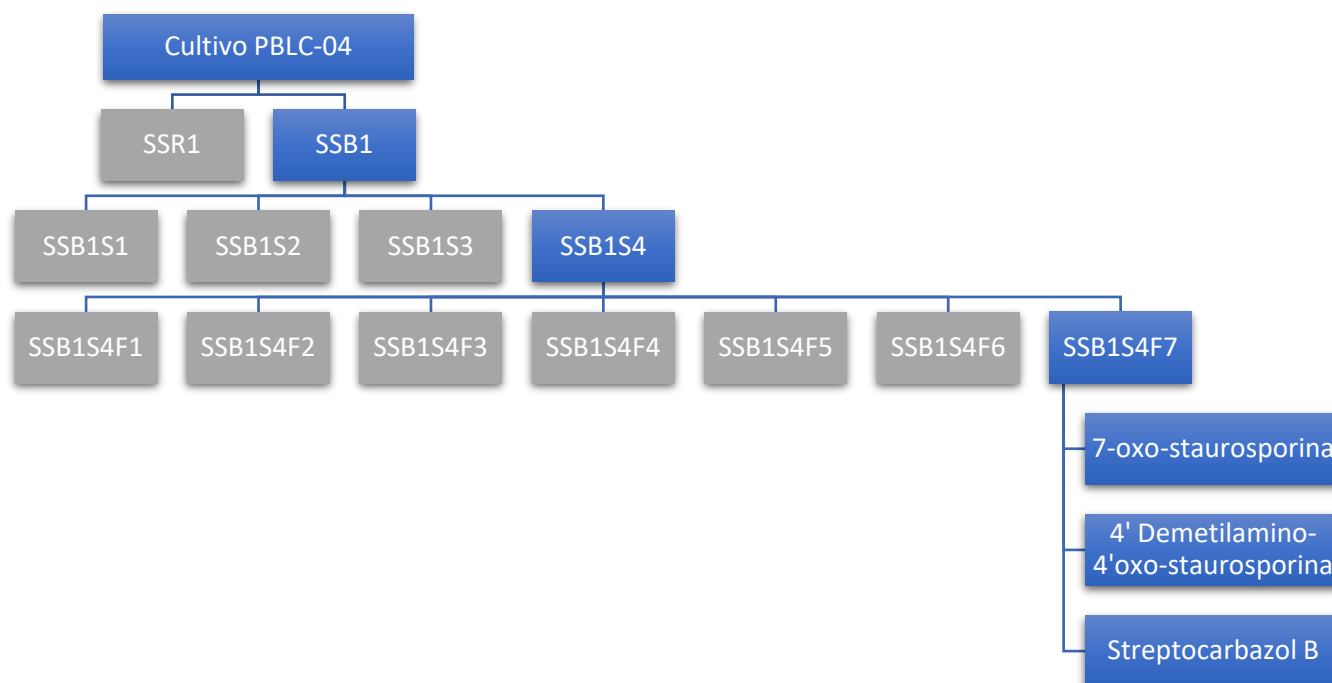


Figura 6. Esquema de las fracciones obtenidas de *Streptomyces sanyensis*. En azul, las fracciones más activas.

El extracto madre y las fracciones posteriores presentaron las siguientes actividades frente a las formas promastigote y epimastigote de los parásitos:

Fracciones	CI <sub>50</sub>		
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. donovani</i>	<i>T. cruzi</i>
<b>PBLC-04</b>	0,57 ± 0,08	21,74 ± 1,89	2,79 ± 0,19
<b>SSB1</b>	7,25 ± 2,34	7,56 ± 0,66	1,61 ± 0,52
<b>SSB1S4</b>	0,82 ± 0,14	1,48 ± 0,28	0,33 ± 0,02
<b>SSB1S4F7</b>	0,0064 ± 0,0015	0,32 ± 0,05	0,82 ± 0,38

Tabla 1. Concentraciones inhibitorias 50, en µg/mL, del extracto madre y sus fracciones.

Según los valores de las CI<sub>50</sub> obtenidos, observamos que la fracción SSB1S4F7 fue la más activa frente a las dos especies de *Leishmania* estudiadas, con una marcada selectividad hacia *L. amazonensis*. Por otro lado, la fracción SSB1S4 fue la más efectiva contra *Trypanosoma cruzi*, presentando este parásito una sensibilidad mayor que *Leishmania* al ser expuesto a la fracción SSB1. Por último, destaca la resistencia de *L. donovani* a la acción de las fracciones, sobre todo frente al extracto madre, cuya concentración inhibitoria supera más de veinte veces a la de *L. amazonensis*.

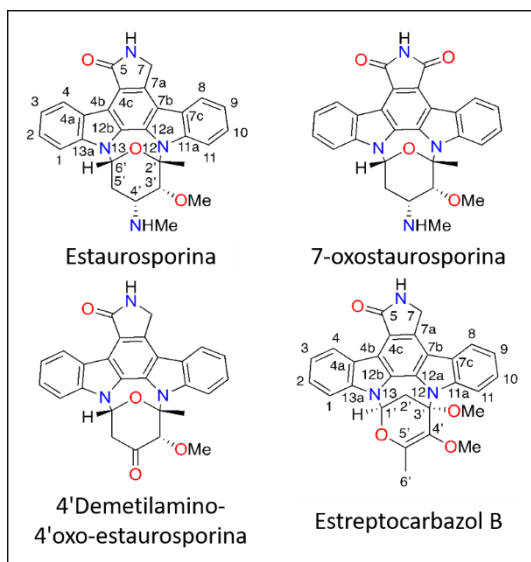


Figura 7. Estructura química de la estaurosporina y de los tres compuestos puros obtenidos.

A partir de la fracción SSB1S4F7, que demostró una mayor actividad antiparasitaria, se aislaron 3 compuestos puros en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica (IUBO): la 7-oxoestaurosporina, 4' Demetilamino-4'oxo-estaurosporina y el estreptocarbazol B (Figura 7). Estas tres moléculas tienen una estructura tipo indocarbazol con similitud estructural con la estaurosporina, fármaco experimental empleado como antitumoral por su capacidad como inductor de la apoptosis<sup>22</sup>. Los datos de actividad obtenidos se muestran en la tabla 2.

Compuestos	CI <sub>50</sub>		
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. donovani</i>	<i>T. cruzi</i>
<b>7-oxoestaurosporina</b>	1,36 ± 0,85	0,27 ± 0,03	0,55 ± 0,40
<b>4'Demetilamino-4'oxo-estaurosporina</b>	7,73 ± 2,16	>20	5,92 ± 3,17
<b>Estreptocarbazol B</b>	4,23 ± 1,09	>20	5,82 ± 0,96
<b>Miltefosina</b>	2,64 ± 0,10	1,35 ± 0,19	-
<b>Benznidazol</b>	-	-	1,81 ± 1,07

Tabla 2. Concentraciones inhibitorias 50, en µg/mL, de los compuestos puros obtenidos, así como de los tratamientos de referencia miltefosina y benznidazol.

La 7-oxoestaurosporina destacó frente al resto de compuestos aislados, presentando valores de CI<sub>50</sub> menores que los fármacos de referencia: 1,94 y 5,03 veces más activo que la miltefosina, para *L. amazonensis* y *L. donovani* respectivamente y 3,27 veces más potente que el benznidazol.

Al visualizar los cultivos al microscopio, observamos cambios morfológicos en los parásitos bajo la influencia de la 7-oxoestaurosporina: su forma se redondea y aparece una dilatación en el bolsillo flagelar, una invaginación de la membrana plasmática en la base del flagelo típica de los kinetoplastidos, cuya integridad es crítica para la interacción parásito-hospedador<sup>23</sup>. Además, la movilidad se reduce en gran medida, haciendo que los promastigotes se depositen en el fondo de la placa y se vea un mayor número de células que en el control negativo.

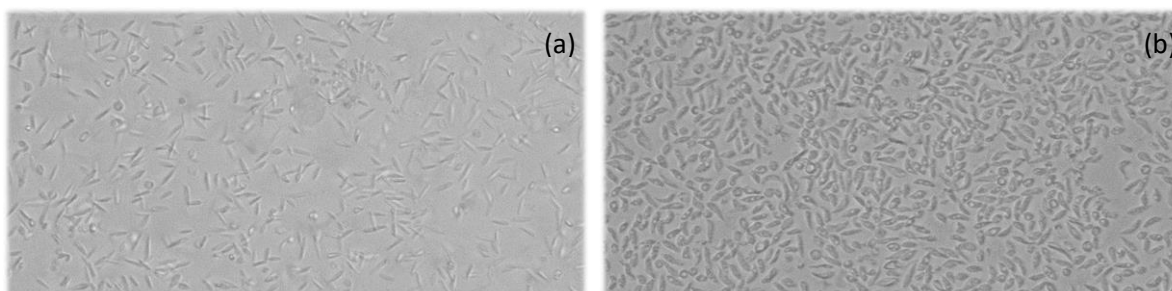


Figura 8. Promastigotes de *Leishmania donovani*, ambas fotografías están tomadas a 20x. (a) Control negativo, (b) 7-oxoestaurosporina a 5 µg/mL.



En estudios posteriores se evaluaron los efectos tóxicos de los compuestos puros en macrófagos y se calcularon los índices de selectividad a partir de las concentraciones citotóxicas e inhibitorias (Tabla 3). La 7-oxostaurosporina presentó la toxicidad más alta, coincidiendo con su mayor actividad, en comparación a los otros compuestos, aun así, su índice de selectividad frente a *L. donovani* es 9,3, indicando en este caso una selectividad notable en la acción frente al parásito.

	CC <sub>50</sub>	Índice de Selectividad		
	Macrófagos	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. donovani</i>	<i>T. cruzi</i>
<b>7-oxostaurosporina</b>	2,50 ± 0,84	1,84	9,30	4,52
<b>4'Demetilamino-4'oxo-estaurosporina</b>	>20	>20	>20	>20
<b>Estreptocarbazol B</b>	>20	>20	>20	>20
<b>Miltefosina*</b>	29,42 ± 1,25	11,14	29,42	-
<b>Benznidazol*</b>	104,40 ± 1,04	-	-	57,68

Tabla 3. Concentraciones citotóxicas 50, en µg/mL, e índices de selectividad de los compuestos puros y fármacos de referencia.

Sin embargo, al comparar estas moléculas con las moléculas de referencia se deja constancia de la mayor selectividad de estas últimas, debido principalmente a su menor toxicidad. Aun así, hay que tener en cuenta que la dosis de 7-oxostaurosporina que habría que emplear en un posible tratamiento sería mucho menor que la de miltefosina o benznidazol.

Por último, se eligió a la 7-oxostaurosporina para realizar el ensayo de actividad frente a las formas amastigotes de *Leishmania amazonensis* (Tabla 4). Se obtuvieron valores de concentración muy inferiores a los de la miltefosina, además de un índice de selectividad de 45,73; prácticamente el doble que la molécula de referencia evaluada. Estos datos demuestran que la 7-oxostaurosporina es una buena candidata para el desarrollo de un nuevo fármaco para tratar la leishmaniosis, por lo que se debería de continuar con su investigación.

	CI <sub>50</sub>	Índice de selectividad
<b>7-oxostaurosporina</b>	0,05 ± 0,00	45,7
<b>Miltefosina</b>	1,27 ± 0,12	23,2

Tabla 4. Concentraciones inhibitorias 50, en µg/mL, sobre amastigotes de *Leishmania amazonensis* e índice de selectividad

## 2.- Mecanismo de acción sobre *Leishmania*:

Como estudio complementario a los ensayos de actividad y toxicidad se realizaron evaluaciones de los mecanismos de muerte inducida por la 7-oxostaurosporina sobre las formas promastigotes de *Leishmania*.

En *Leishmania amazonensis* destacan los resultados de los ensayos con JC-1 y con yoduro de propidio (Figura 8). Tras incubar con el JC-1 se observa un aumento de los monómeros verdes del cultivo con 7-oxostaurosporina, indicando una disminución en el potencial de membrana mitocondrial de los promastigotes. Esta modificación del potencial altera las reacciones de la cadena respiratoria lo que disminuye la síntesis de ATP en la célula<sup>24</sup>. Por otro lado, la coloración rojiza del yoduro de propidio indica un aumento significativo del número de células muertas por la acción del compuesto, dejando patente su acción leishmanicida.

Los ensayos con Hoechst y Sytox Green dieron resultados negativos (sin diferencias significativas de coloración entre el control y la 7-oxostaurosporina), manifestando que no hay cambios en la densidad de la cromatina ni en la permeabilidad de la membrana celular respectivamente.

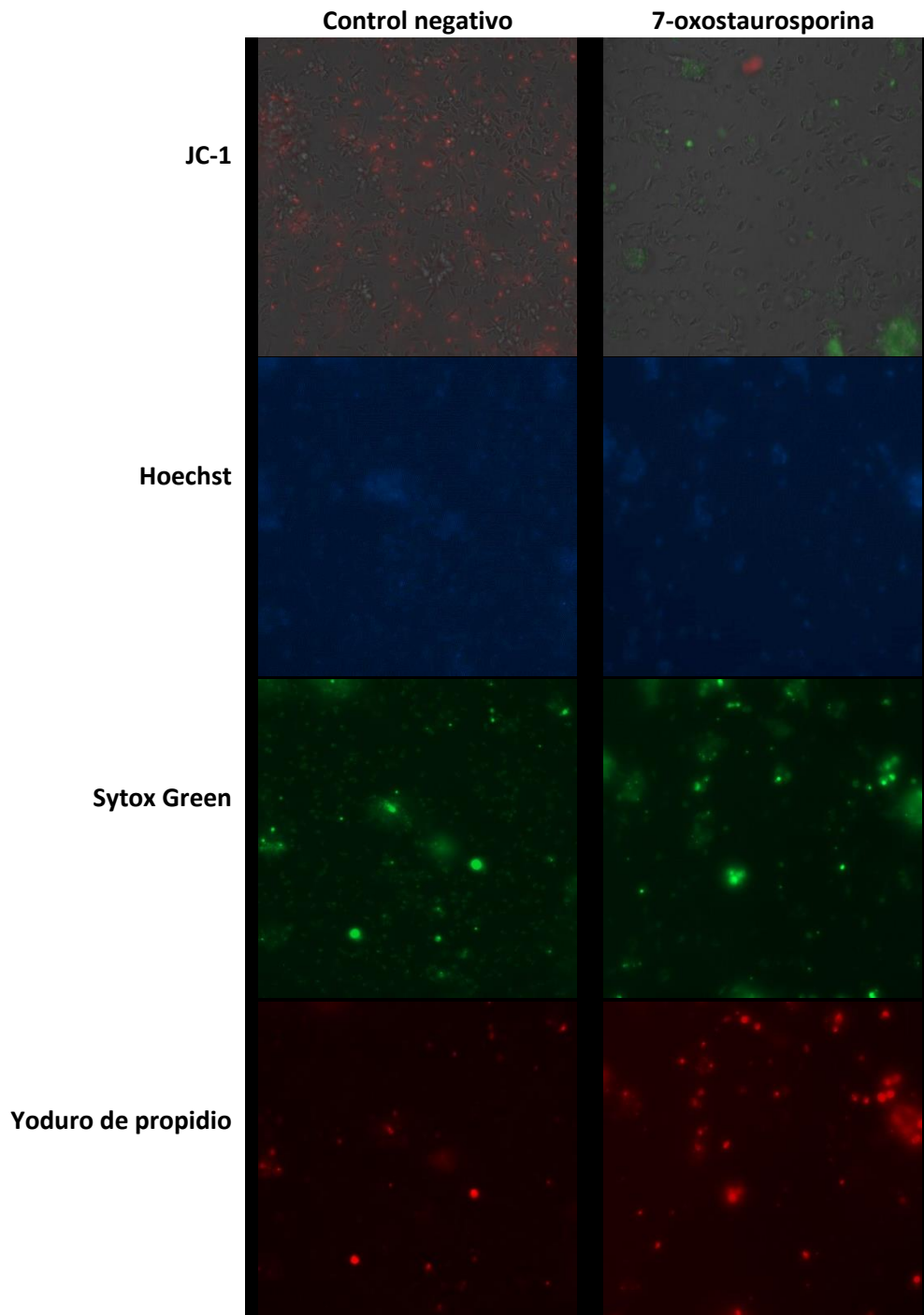


Figura 9. Estudio de los mecanismos de acción en *Leishmania amazonensis*

Para *Leishmania donovani* (Figura 9), los resultados con Sytox green indican que en este caso si se modifica la permeabilidad de las membranas de los parásitos, mientras que el JC-1 sin fluorescencia verde revela que el potencial mitocondrial se mantiene estable, hechos no

observados en *L. amazonensis*. Mientras tanto, las pruebas con Hoechst y yoduro de propidio concluyen de manera similar en ambas cepas, sin alteraciones en la densidad de la cromatina, y una mayor muerte celular. En este caso el número de células muertas es mayor, según se predecía tras los ensayos de actividad.

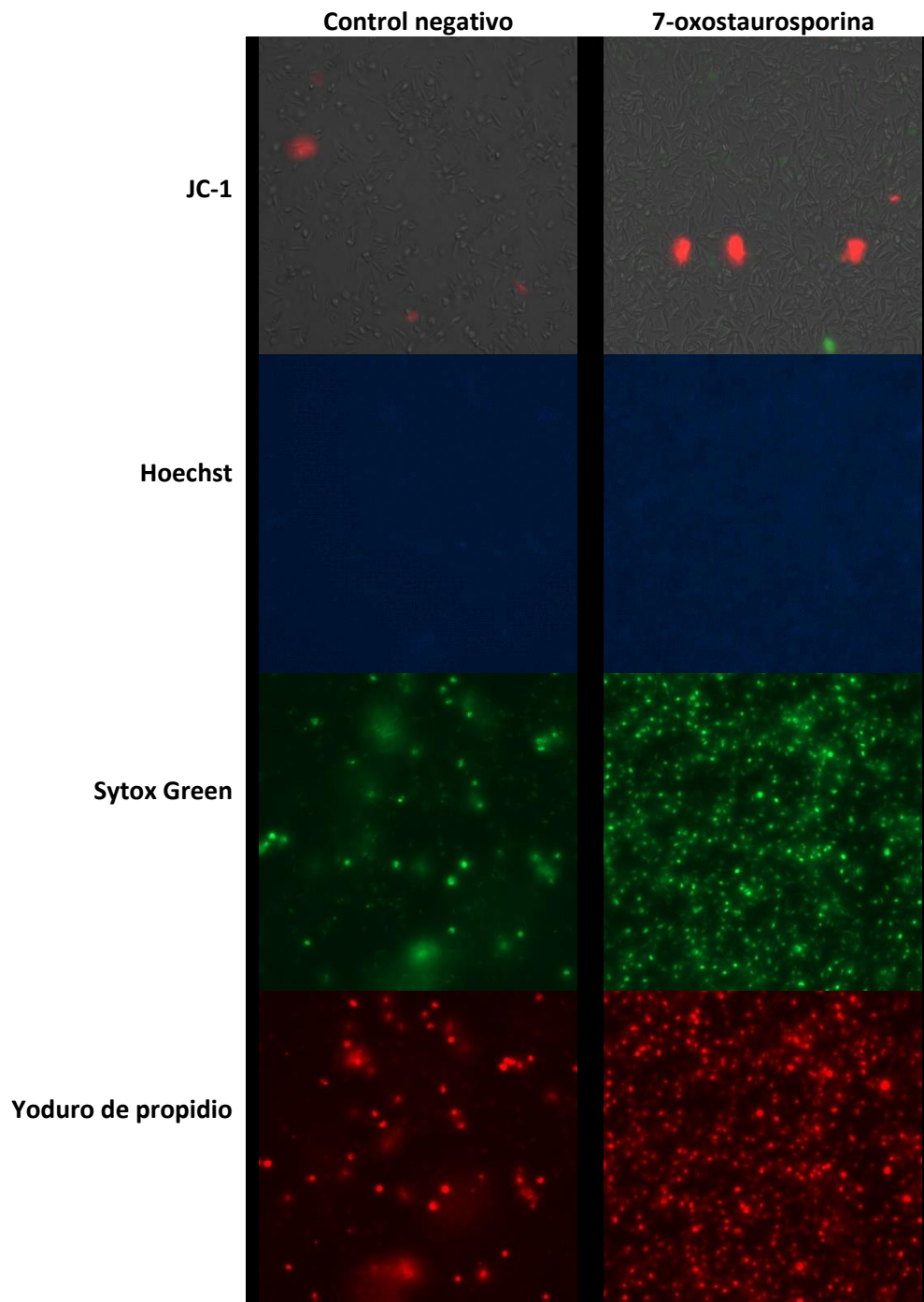


Figura 10. Estudio de los mecanismos de acción en *Leishmania donovani*.

Al medir los valores de emisión de fluorescencia del ensayo con JC-1 (Figura 10), se corrobora que la 7-oxostarosporina disminuye en mayor medida el potencial de la membrana mitocondrial de *L. amazonensis* que el de *L. donovani*, que se altera mínimamente.

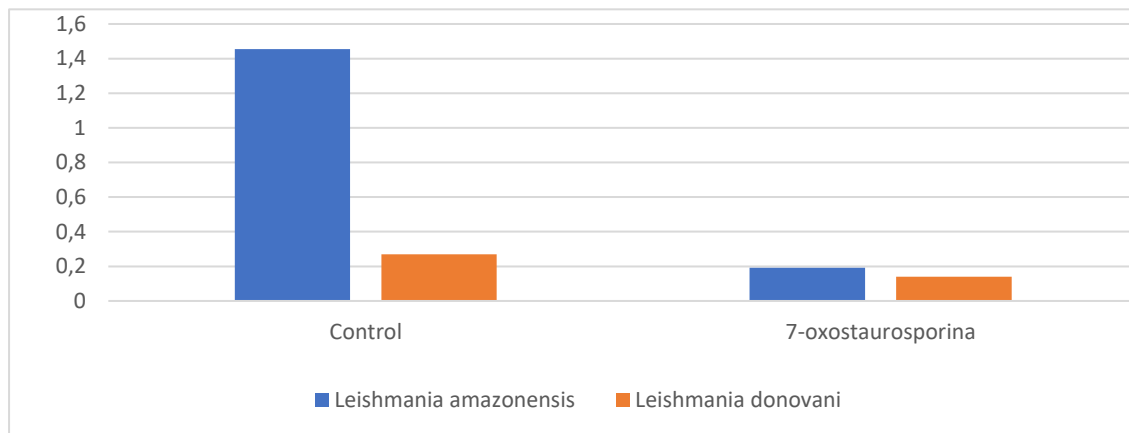


Figura 11. Ratios de emisión de fluorescencia (rojo/verde) del ensayo con JC-1

## Conclusiones

1. Tanto el extracto crudo PBLC-04, como las diferentes fracciones ensayadas presentan elevada actividad frente a promastigotes de *Leishmania amazonensis*, *L. donovani*, y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
2. La 7-oxostaurosporina presenta mayor actividad frente a promastigotes de *L. amazonensis*, *L. donovani*, y epimastigotes de *T. cruzi* que las moléculas de referencia.
3. La 7-oxostaurosporina muestra una buena relación actividad/citotoxicidad frente a promastigotes de *L. donovani*.
4. La 7-oxostaurosporina presenta mayor selectividad frente a amastigotes de *L. amazonensis* que la molécula de referencia.
5. La 7-oxostaurosporina actúa de forma diferente en las especies de *Leishmania* estudiadas.

## Bibliografía

1. CDC - Parasites - About Parasites [sitio web]. Centers for Disease Control and Prevention [consultado 18 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/about.html>
2. Donelson J, Gardner M, El-Sayed N. More surprises from Kinetoplastida. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(6):2579-2581.
3. CDC - Neglected Tropical Diseases - Diseases [sitio web]. Centers for Disease Control and Prevention [consultado 18 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html>
4. World Health Organization [sitio web]. World Health Organization. [consultado 18 mayo 2019]. Disponible en: [https://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)
5. Georgiadou S, Makaritsis K, Dalekos G. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *Journal of Translational Internal Medicine*. 2015;3(2):43-50.
6. Bern C, Maguire J, Alvar J. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2008;2(10): e313.
7. CDC - Leishmaniasis - Biology [sitio web]. Centers for Disease Control and Prevention [consultado 18 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
8. Preguntas sobre la Leishmaniosis canina (I)- Última Hora – Medium [sitio web]. Medium [consultado 27 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://medium.com/@UltimaHoracom/preguntas-sobre-la-leishmaniosis-canina-i-c322f3fc09b8>
9. CDC - Leishmaniasis - Disease [sitio web]. Centers for Disease Control and Prevention [consultado 18 abril 2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html>
10. Photos on leishmaniasis for download [sitio web]. World Health Organization. [consultado 19 de mayo de 2019]. Disponible en: [https://www.who.int/leishmaniasis/resources/photo\\_gallery/gallery/en/](https://www.who.int/leishmaniasis/resources/photo_gallery/gallery/en/)
11. Clinical forms of the leishmaniasis [sitio web]. World Health Organization. [consultado 19 de mayo de 2019]. Disponible en: [https://www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical\\_forms\\_leishmaniasis/en/index1.html](https://www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniasis/en/index1.html)
12. Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin J, Barrett M, López-Vélez R, García-Hernández R et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2017;11(12): e0006052.
13. Teixeira A, Nitz N, Guimaro M, Gomes C, Santos-Buch C. Chagas disease. *Postgraduate Medical Journal*. 2006;82(974):788-798.
14. Flores-Ferrer A, Marcou O, Waleckx E, Dumonteil E, Gourbière S. Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we know and what do we need? *Evolutionary Applications*. 2017;11(4):470-487.
15. CDC - Chagas Disease - Biology [sitio web]. Centers for Disease Control and Prevention [consultado 19 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>



16. Esch KJ, Petersen CA. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):58-85.
17. Vieira J, Távora F, Sobral M, Vasconcelos G, Almeida G, Fernandes J et al. Chagas Cardiomyopathy in Latin America Review. *Current Cardiology Reports.* 2019;21(2).
18. Enfermedad [sitio web]. Centers for Disease Control and Prevention [consultado 19 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/enfermedad.html>
19. More on Chagas disease symptoms [sitio web] World Health Organization. [consultado 19 de mayo de 2019]. Disponible en: [https://www.who.int/chagas/disease/home\\_symptoms\\_more/en/](https://www.who.int/chagas/disease/home_symptoms_more/en/)
20. Treatment of Chagas disease [sitio web] World Health Organization. [consultado 19 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/chagas/disease/treatment/en/>
21. alamarBlue Cell Viability Reagent – Thermo Fisher Scientific [sitio web] Thermo Fisher Scientific. [consultado 27 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DAL1025>
22. Malsy M, Bitzinger D, Graf B, Bundscherer A. Staurosporine induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells PaTu 8988t and Panc-1 via the intrinsic signaling pathway. *European Journal of Medical Research.* 2019; 24(1).
23. Sunter J, Yanaseb R, Wangb Z, Costa C, Moreira-Leitea F, Myskovae J et al. *Leishmania* flagellum attachment zone is critical for flagellar pocket shape, development in the sandfly, and pathogenicity in the host. *PNAS.* 2019; 116(13): 6351-6360.
24. Joshi, D. C., Bakowska, J. C. Determination of Mitochondrial Membrane Potential and Reactive Oxygen Species in Live Rat Cortical Neurons. *Journal of Visualized Experiments.* 2011; 51: e2704