

## Bloque III 1ª parte:

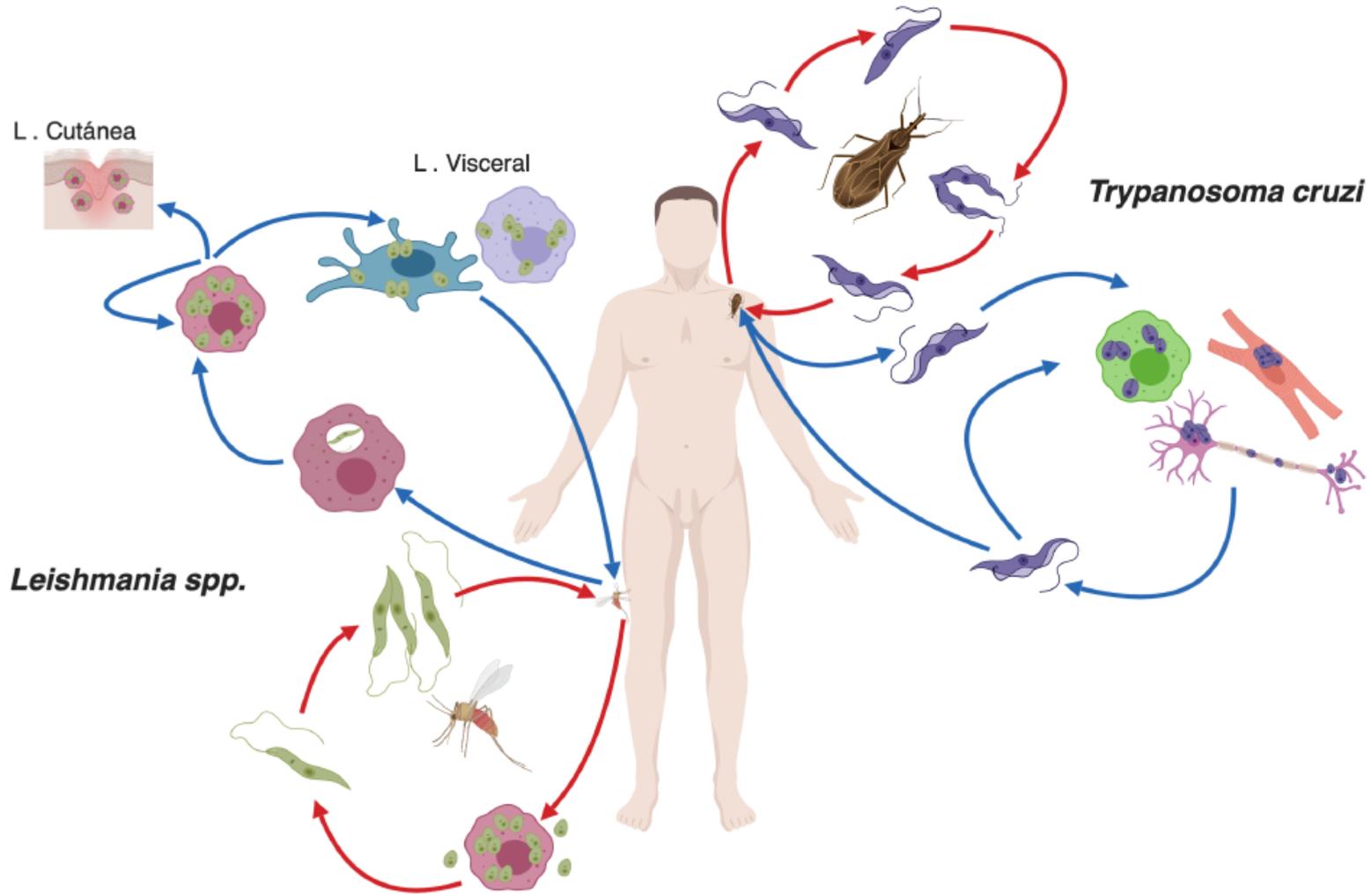
Búsqueda de nuevos compuestos de origen natural frente a la  
Leishmaniasis, la enfermedad de Chagas y las amebiasis

Dr. José Piñero

Dra. Ines Sifaoui

Dra. Atteneri López

# Agentes infecciosos y ciclos de vida



# Patología de la leishmaniasis

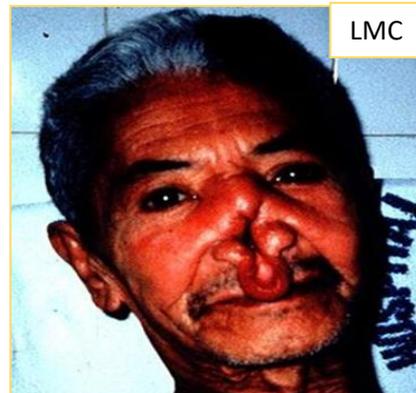
## Cutánea (LC)

- Lesiones no dolorosas, en el lugar de la picadura.
- Úlceras que progresan a nódulos eritematosos, con costra o exudado.
- La “leishmaniosis cutánea difusa” (LCD) inicia como LC y se disemina por el cuerpo.



## Mucocutánea (LMC)

- Destrucción del tejido nasofaríngeo → lesiones desfigurantes.
- Ulceración y perforación del tabique.
- Se compromete el estado del paciente → dificultad para la alimentación y respiración.



## Visceral (LV)

- Forma más grave. Infección sistémica que de no ser tratada puede ser fatal.
- Visceralización del parásito debido al fallo de la respuesta inmune.
- Hepato-esplenomegalia severa.



# Patología de la enfermedad de Chagas

## Aguda

- Asintomática o se manifiesta con fiebre, malestar, esplenomegalia y hepatomegalia.
- Chagoma o Signo de Romaña: edema en párpado o conjuntiva ocular.
- Miocarditis, aparición de arritmias y meningoencefalitis

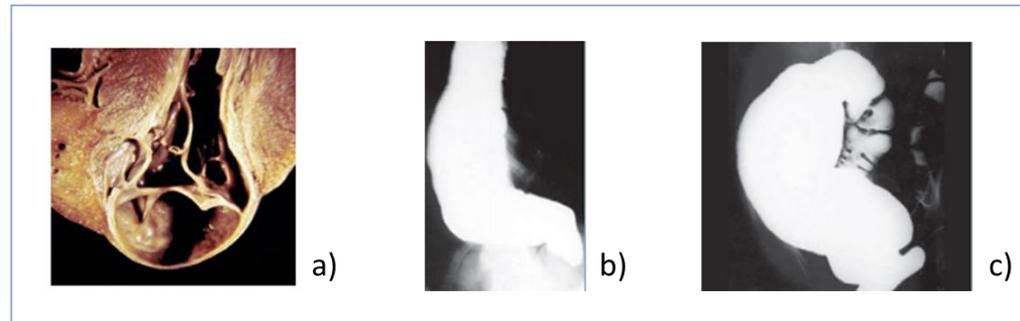


## Indeterminada

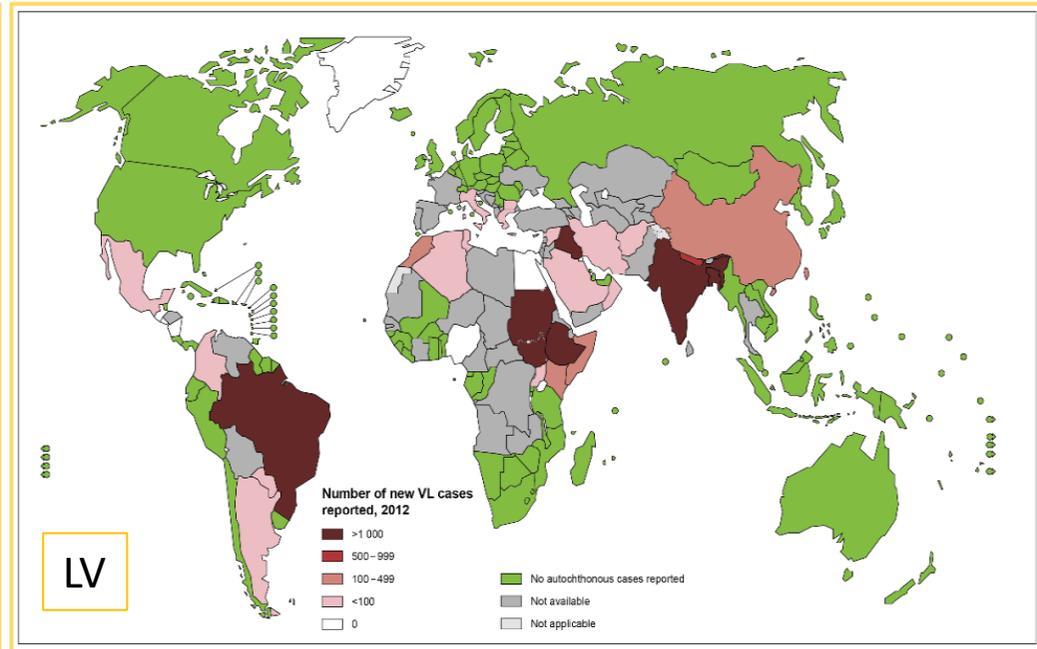
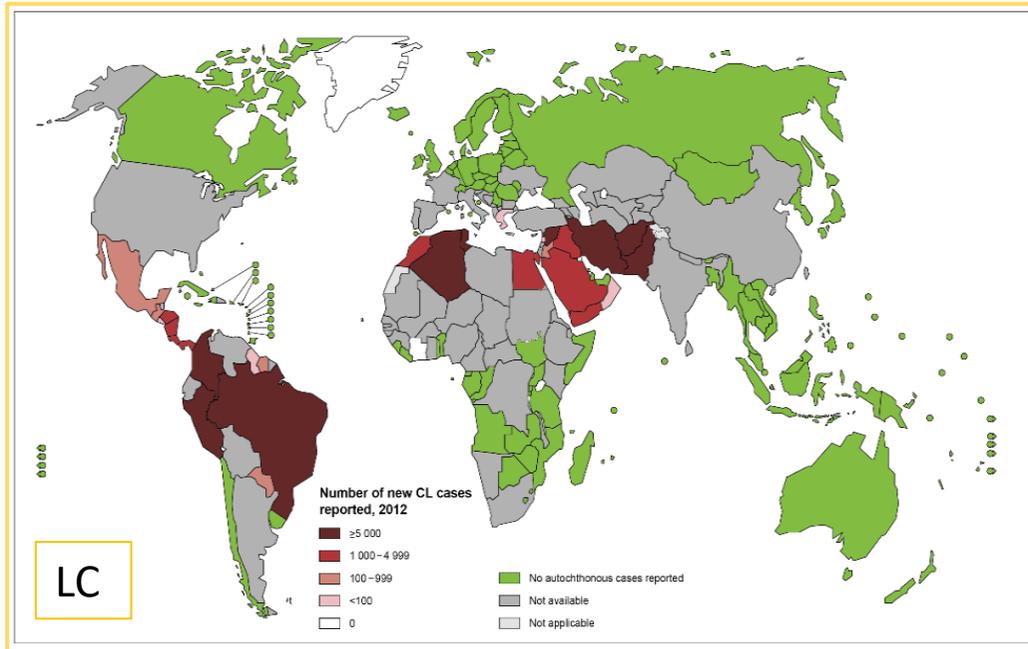
- Los síntomas remiten al disminuir la parasitemia. Puede durar meses o años antes de que se manifieste la fase crónica.
- 60-70% de los infectados presentan esta fase.

## Crónica

- 30-40% de los infectados desarrollan la enfermedad sintomática crónica.
- Afecciones cardíacas<sup>a</sup>, digestivas y cardiodigestivas (Megaesófago<sup>b</sup>, megacolon<sup>c</sup>, cardiopatía chagásica)
- Ocurren entre 10-30 años después de la infección inicial.



# Distribución y epidemiología de la leishmaniasis

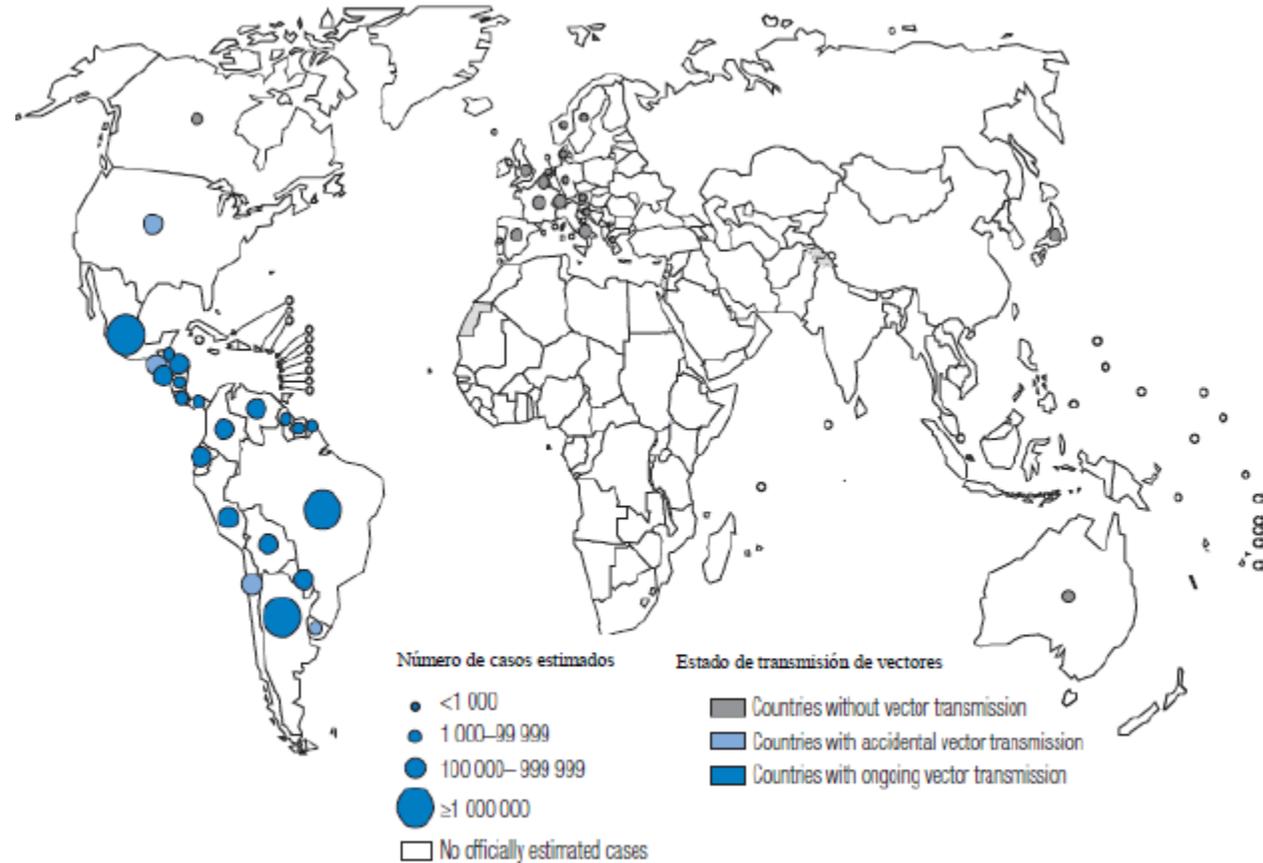


- Endémica de 88 países.
- 350 M personas en riesgo.
- 1,5-2 M personas la desarrollan por año.
- 70.000 muertes al año. 90% sólo en 6 países.
- Asociada a VIH (cuenca mediterránea).
- 24 spp. de *Leishmania*.

- 70 spp. de vector.
- Reservorios hospedadores.
- Enfermedad emergente y re-emergente.
- Datos oficiales no reflejan la realidad.
- Factores: malnutrición, inmunosupresión, movimientos de población, cambios climáticos y medioambientales, factores socioeconómicos.

# Distribución y epidemiología de la enfermedad de Chagas

- Endémica en 21 países, pertenecientes al sur, centro y norte de América.
- Bolivia, Argentina, Honduras, El Salvador y Paraguay los países donde la prevalencia es más elevada.
- Debido a los movimientos migratorios → aumento de casos en países no endémicos (Australia, Canadá, Japón, España o Estados Unidos)
- La OMS estima que 10 millones de personas están infectadas y 90 millones se encuentran en riesgo



# Opciones terapéuticas disponibles

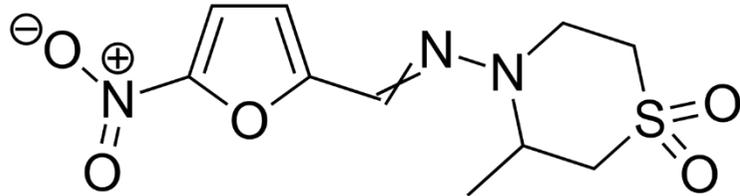


- Limitados
- Tóxicos
- Prolongados
- Intrahospitalarios
- Aparición de resistencias
- Contraindicaciones para administración
- Baja eficacia





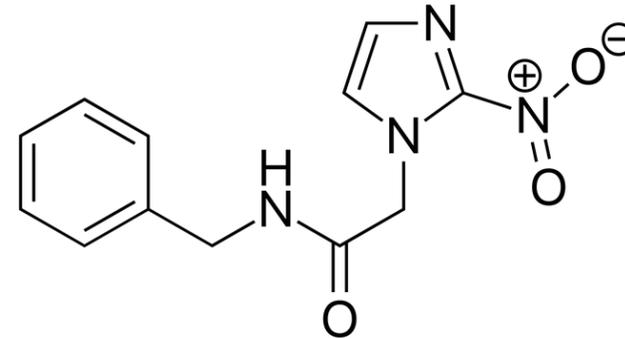
# Tratamientos actuales frente al Chagas



## NIFURTIMOX

-Administración: Adultos: 8-10 mg/Kg cada 4h durante 90-120 días.

-Efectos adversos: desorientación, insomnio, neuropatía, convulsiones, náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, dermatitis.

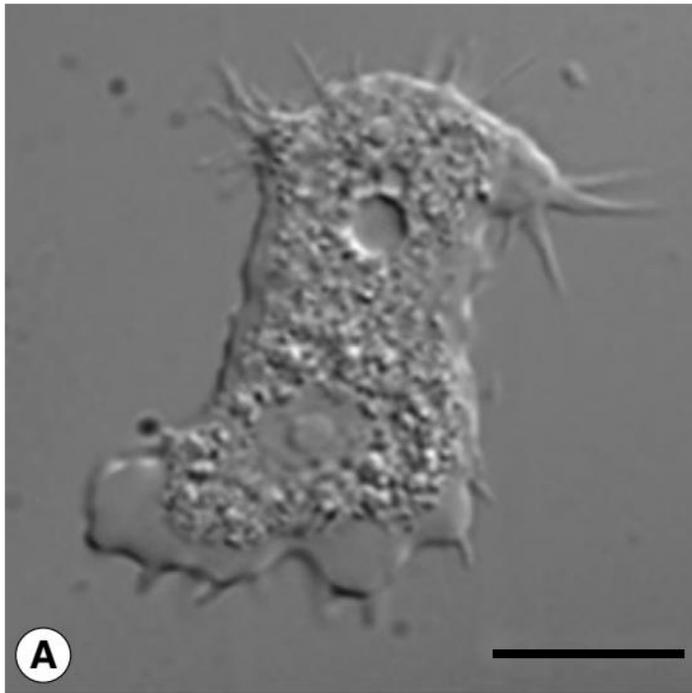


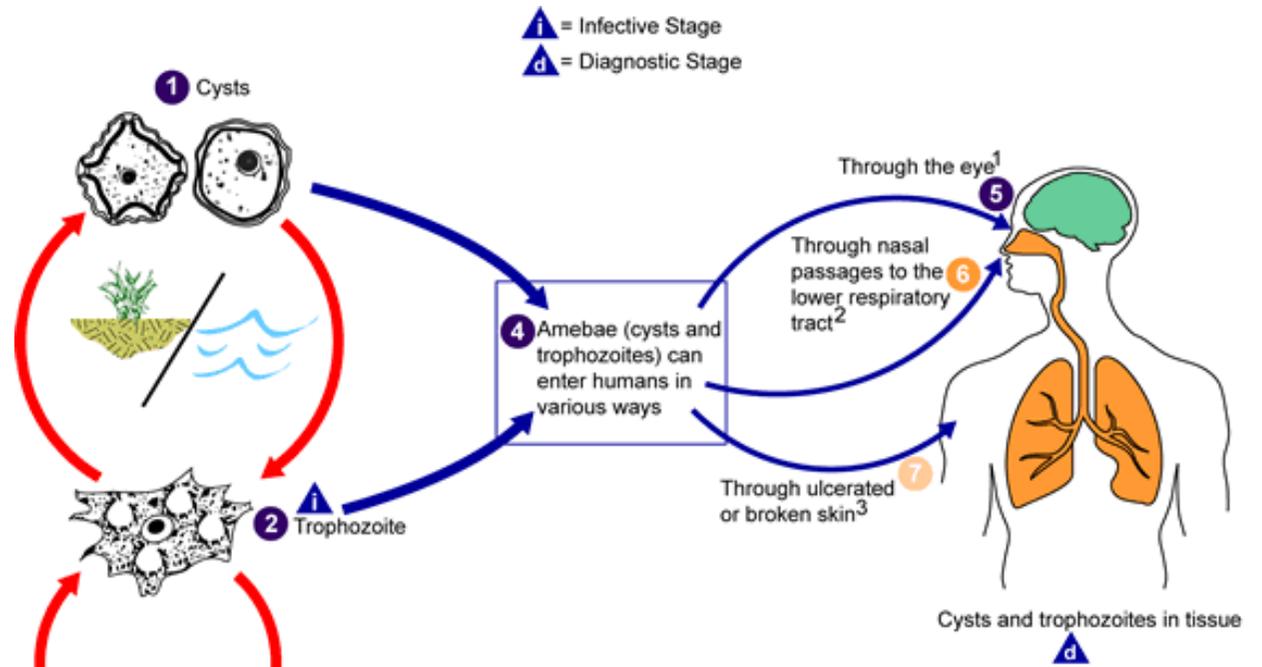
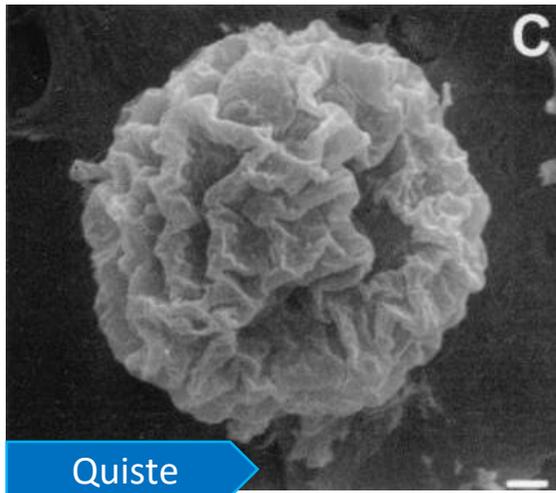
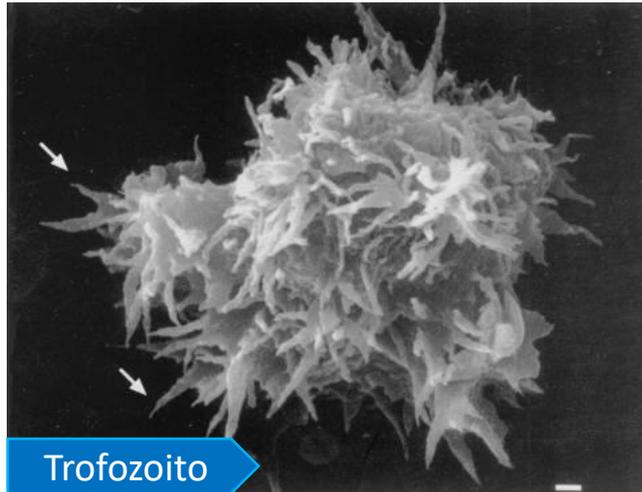
## BENZNIDAZOL

-Administración: Adultos: 5 mg/Kg/día durante 90 días.

-Efectos adversos: erupción, edema, fiebre, adenopatías, mialgia y artralgia. Trombocitopenia púrpura y agranulocitosis. Polineuropatía, parestesia y polineuritis periférica.

# *Acanthamoeba* y las queratitis

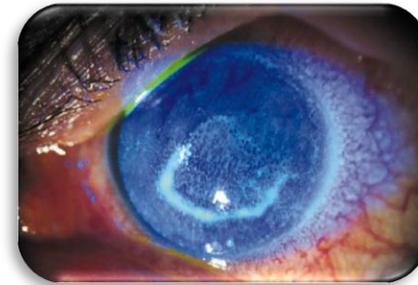




- 1 Results in severe keratitis of the eye. 8
- 2 Results in granulomatous amebic encephalitis (GAE) and/or disseminated disease 10 in individuals with compromised immune systems. 9
- 3 Results granulomatous amebic encephalitis (GAE), disseminated disease 10, or skin lesions 11 individuals with compromised immune systems. 9

# Patología: Queratitis por *Acanthamoeba*

- DOLOR AGUDO
- FOTOFOBIA
- ROJEZ OCULAR
- ÚLCERA CORNEAL → ANILLO



## Distribución y epidemiología de la queratitis por *Acanthamoeba*

- El uso de lentillas es el riesgo más común de sufrir una Queratitis por *Acanthamoeba*, que representa en torno al 80% de los casos.
- La infección puede remitir si se diagnostica y se trata en las primeras etapas de la enfermedad.
- Con la progresión de la infección los tratamientos requeridos son más agresivos → transplante de córnea / enucleación.
- Sin embargo, EEUU → 30 M usuarios → 150 casos por año.



## Tratamientos disponibles frente a la queratitis por *Acanthamoeba*

- Para el ojo

BIGUANIDAS

- PHMB, CLORHEXIDINA

ESTATINAS

VORICONAZOL



- Para las lentillas

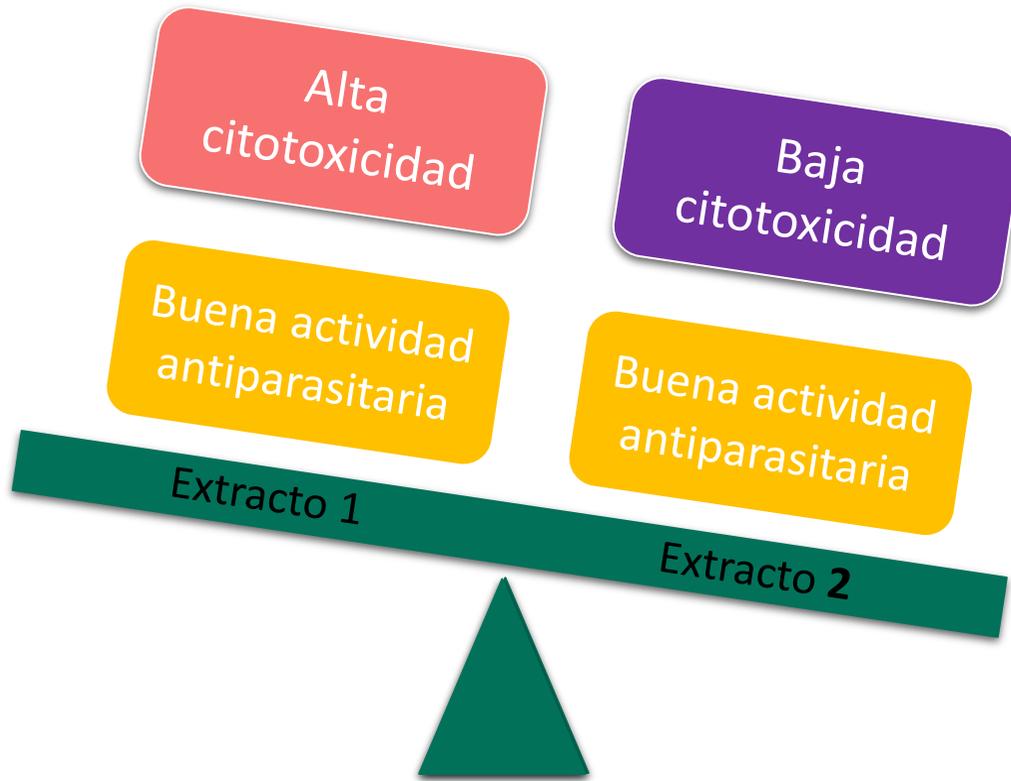
ENZIMÁTICO

PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

POVIDONA-YODADA

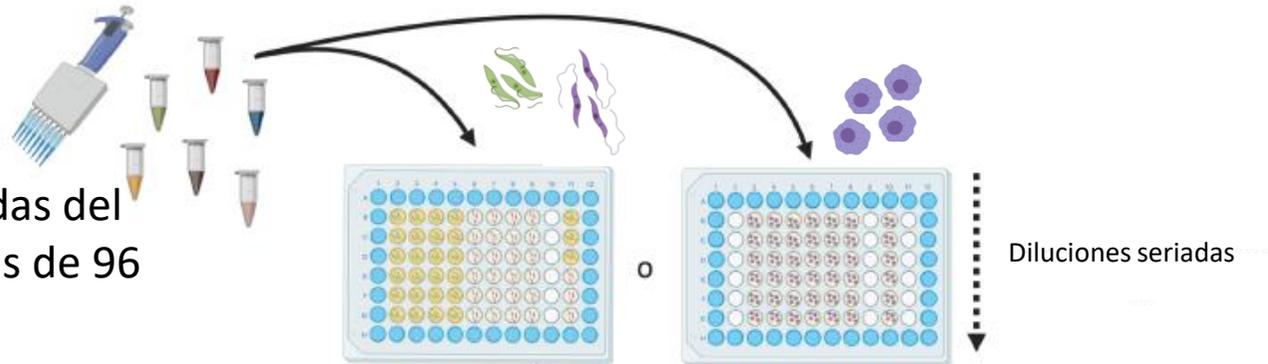
# Métodos para ensayar extractos, fracciones o compuestos en parásitos





1. Lo primero que se hace al probar un extracto/fracción sobre un parásito es un screening.
2. Si el extracto/fracción es activo se calcula su concentración inhibitoria 50 frente al parásito (concentración ala que muere la mitad de la población).
3. Finalmente se determina la toxicidad de los extractos/fracciones frente a células eucariotas superiores (humanas, o de ratón).

- **Métodos para el estudio de la actividad biológica:**  
cálculo de la  $CI_{50}$  o  $CC_{50}$



1. Se preparan diluciones seriadas del compuesto/fracción en placas de 96 pocillos.

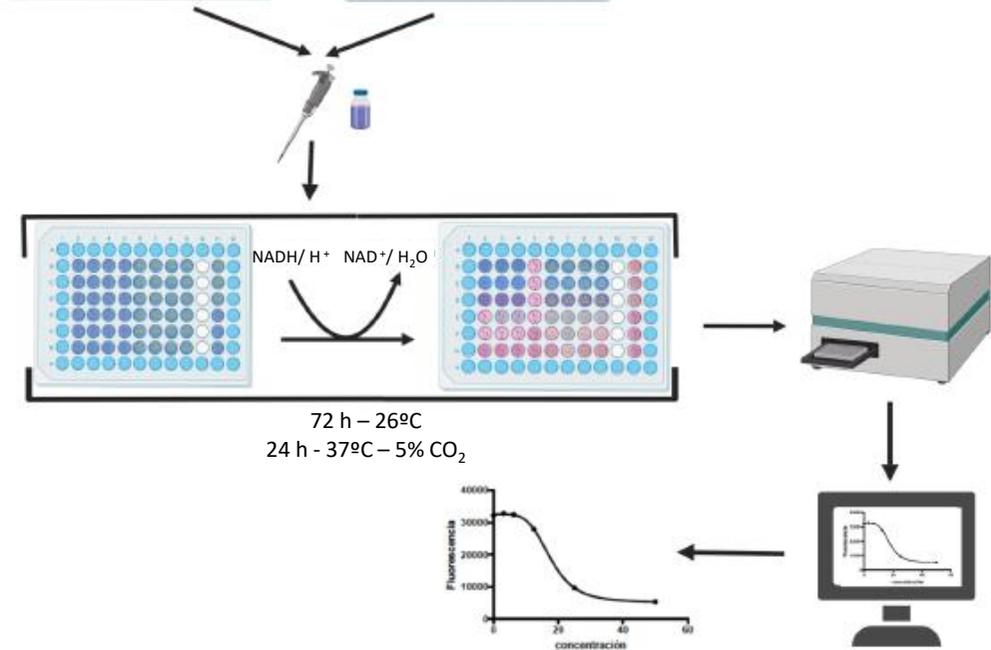
2. Se añaden los parásitos a todos los pocillos.

3. Se añade alamarBlue (10%).

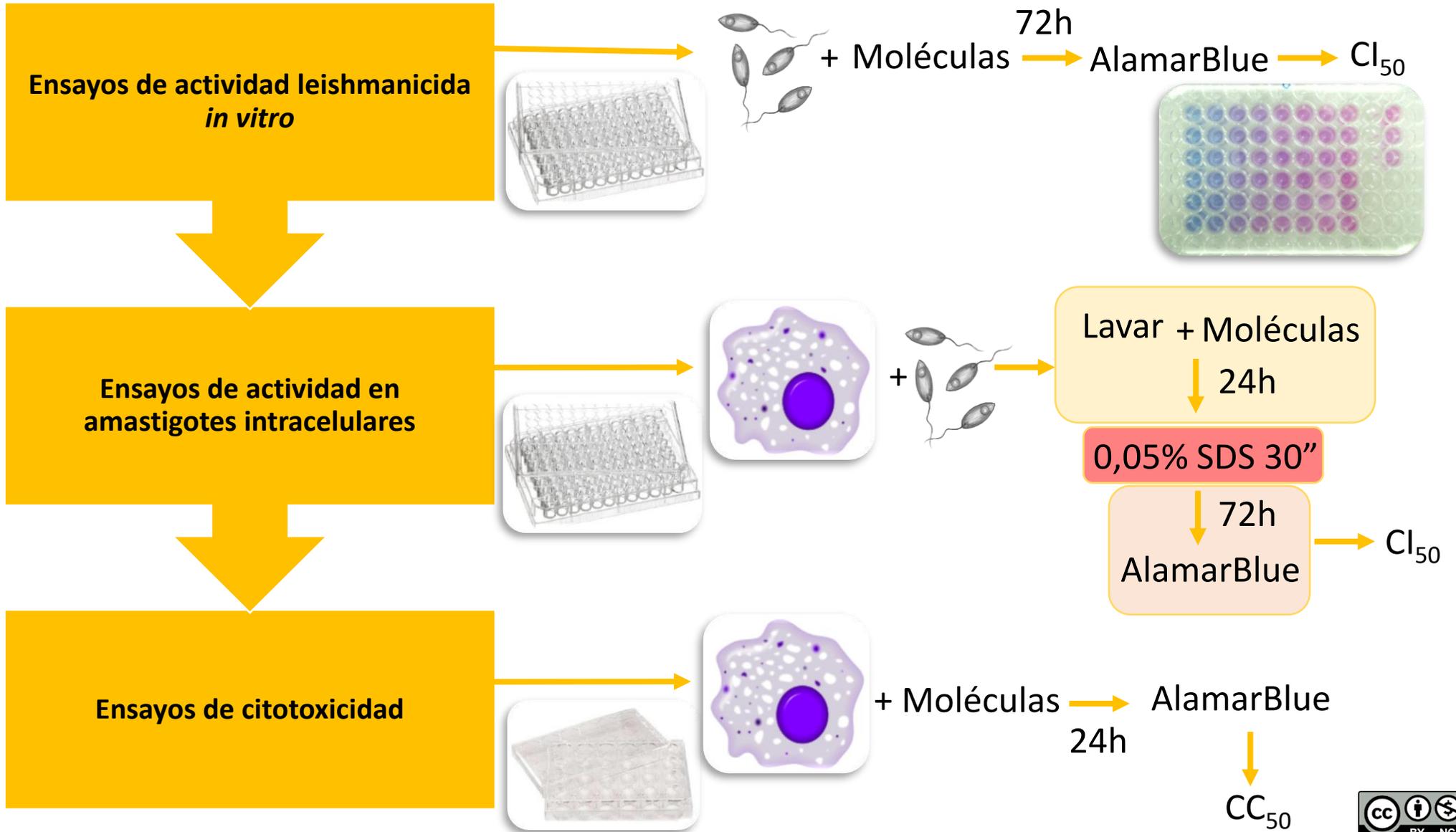
4. Se incuba durante 24-96h a 26°C.

5. Se mide la fluorescencia en un lector de placas.

6. Se calcula la  $CI_{50}$  usando un software como el SigmaPlot o GraphPad.

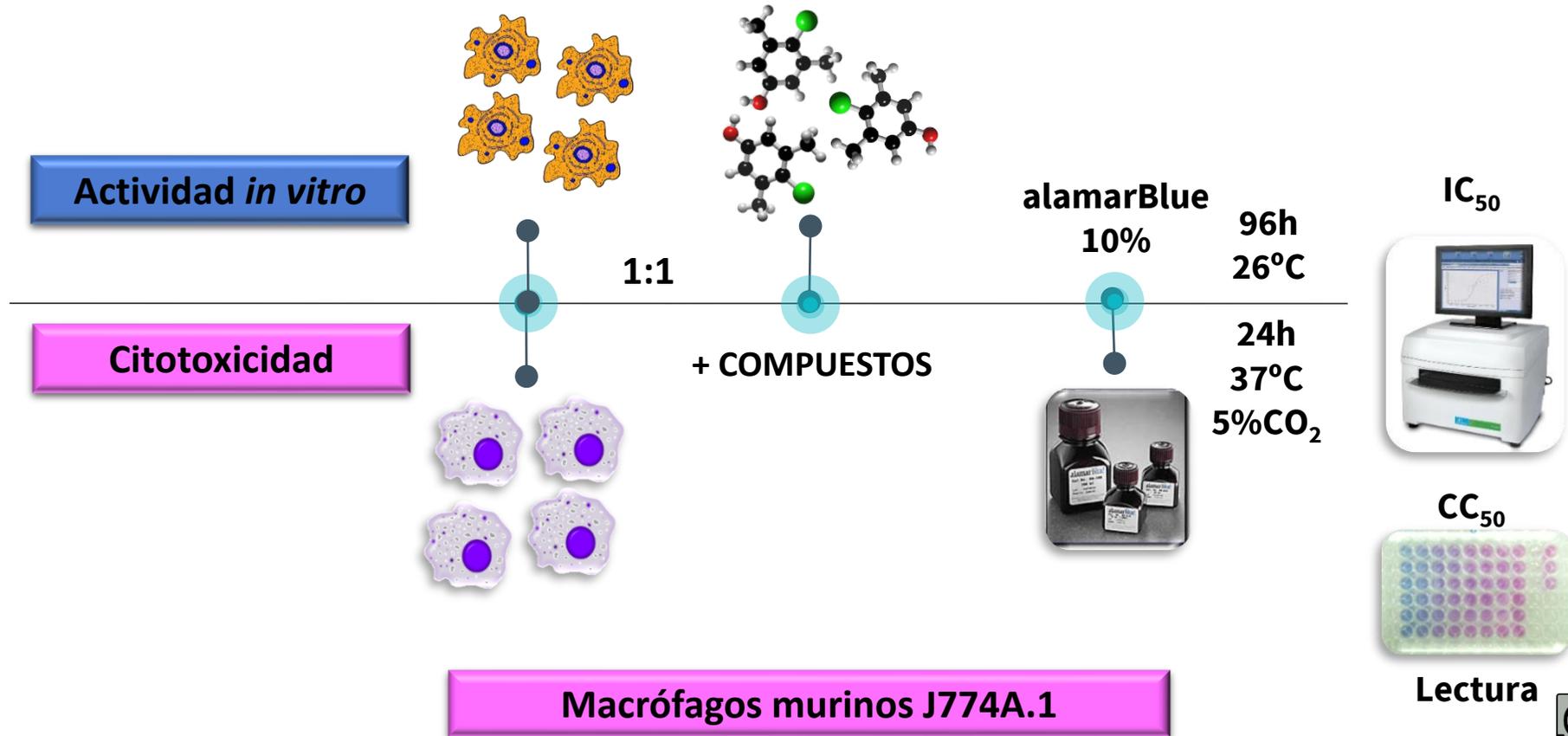


# Métodos para el estudio de la actividad biológica



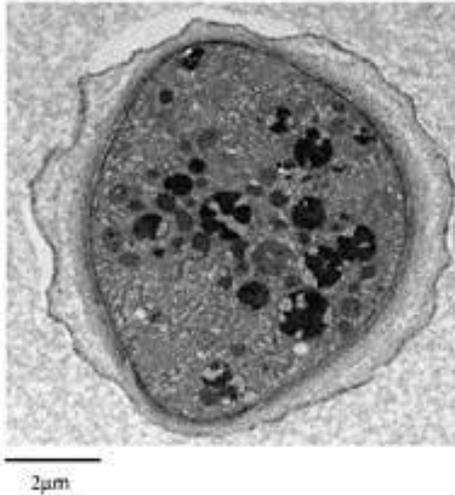
# Diferencias en los ensayos con amebas

- En el caso de los ensayos con células adherentes (amebas, macrófagos,..) se colocan primero las células en la placa.
- Las diluciones seriadas de los compuestos/extractos se realizan en un recipiente aparte (deepwell) y se añaden después a la placa.

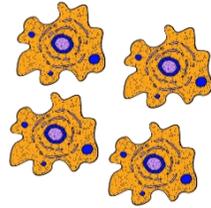


# Ensayos de actividad *in vitro*: frente a los quistes de amebas

Siddiqui y Khan, 2012

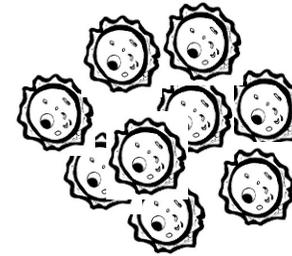


Trofozoítos  
+  
MEDIO DE ENQUISTAMIENTO



AGITACIÓN  
1 SEMANA

Quistes



CAMBIAR A MEDIO DE CULTIVO DE TROFOZOITOS

1 semana

1 semana

+10% alamarBlue



# Índice de Selectividad

- Nos da una idea de cuánto de selectivo es un compuesto frente al parásito, ya que nos relaciona la actividad parasitaria con la citotoxicidad.
- A mayor valor del índice, mayor selectividad presenta el compuesto.

$$\text{Índice de Selectividad} = \text{CC}_{50} / \text{CI}_{50}$$

Principio activo	CI <sub>50</sub> (μM) <i>L. amazonensis</i>
DGV-A ✘	s/a
DGV-B	0,54 ± 0,14
DGV-C	0,71 ± 0,46
DGV-D ✘	s/a
Perifosina	2,82 ± 1,64
Miltefosina	3,12 ± 0,30

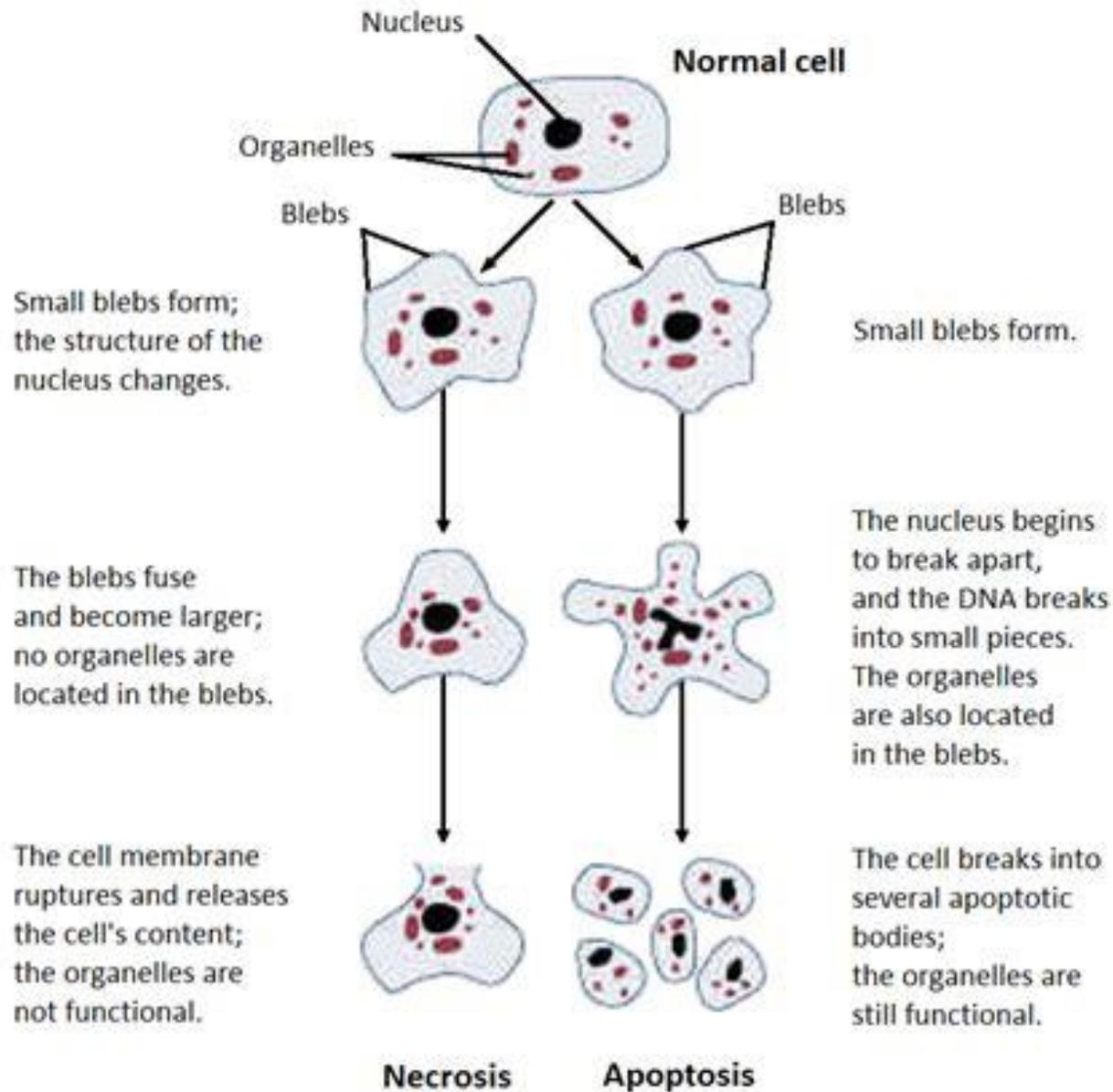


Principio activo	CC <sub>50</sub> (μM)	IS
DGV-B	46,13	86,06
DGV-C	17,53	24,72
Perifosina	65,14	23,07
Miltefosina	72,19	23,17

**Profundización en el conocimiento del tipo de muerte que se produce en el parásito:**

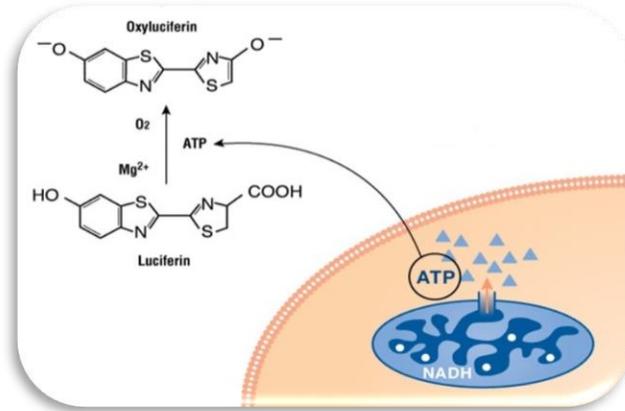
Estudio de los fenómenos típicos de apoptosis y/o necrosis



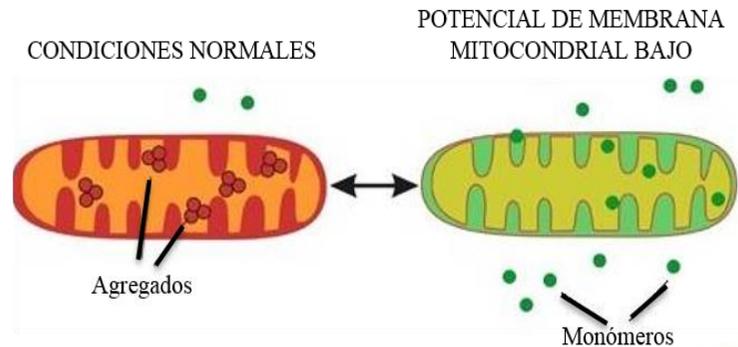


# Determinación del tipo de muerte celular

Análisis de variaciones en los niveles de ATP celular



Análisis del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) JC-1



Análisis de la permeabilidad de la membrana plasmática



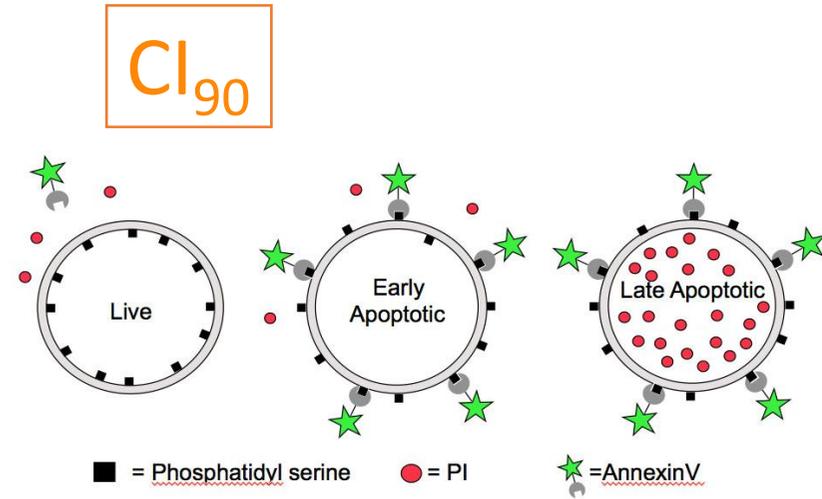
Sytox Green + ADN

**Sytox Green**

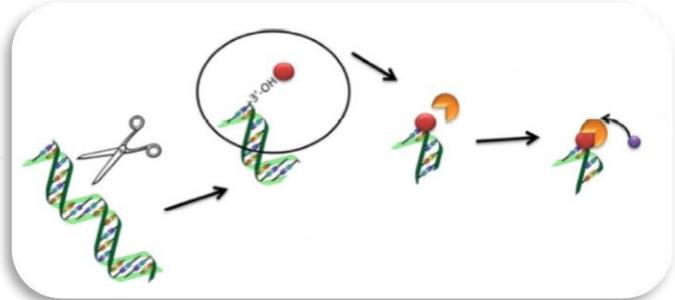
# Determinación del tipo de muerte celular

Análisis de la exposición de residuos de fosfatidilserina

Anexina v + IP



Análisis de fragmentación del ADN mediante *TUNEL*



Análisis de condensación de la cromatina

Hoechst + IP

