

## Fotoinactivación de *Leishmania spp.* por antraquinonas naturales con proyección en terapia fotodinámica antiparasitaria

Becaria Postdoctoral: Dra. Jesica Ayelen Dimmer. Dpto. de Ciencias Farmacéuticas, FCQ, UNC. IMBIV-CONICET.

Directora: Dra. Susana Núñez Montoya. Dpto. de Ciencias Farmacéuticas, FCQ, UNC. IMBIV-CONICET.

Co-Director: Dr. Walter Rivarola. Centro de Estudio e Investigación de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis. Cátedra de Física Biomédica, FCM, UNC.

### Problema de investigación, relevancia e impacto en el contexto local/regional

La leishmaniasis es una enfermedad compleja provocada por protozoarios del género *Leishmania* e integran el grupo de enfermedades desatendidas (ED) en el mundo y con prevalencia en los países más pobres. En Argentina, entre 2013 y 2017 se diagnosticaron 1300 casos de leishmaniasis, donde el 87 % correspondieron a leishmaniasis cutánea (LC). Si bien, el mayor número de casos confirmados están localizados en el norte de nuestro país (área endémica), la dispersión del vector ha provocado reportes de casos en áreas no endémicas, como la provincia de Córdoba, donde además se han detectado vectores competentes.

La LC se manifiesta como una lesión de tipo ulcerosa con bordes elevados luego de la picadura del insecto vector. La falta de tratamiento o la falla terapéutica pueden producir la evolución hacia otras manifestaciones clínicas más graves. Los tratamientos que se emplean actualmente presentan numerosas desventajas, por lo cual resulta indispensable la búsqueda de alternativas terapéuticas.

### Terapia fotodinámica antiparasitaria (TFDAp)

La TFDAp es una terapia localizada que consiste en irradiar sólo la zona afectada (fig. 1a), por lo que resulta más segura y fácil de administrar respecto de una administración sistémica.

Involucra la interacción de tres componentes esenciales: un compuesto fotosensibilizador no tóxico (FS), una fuente de luz con la longitud de onda adecuada al máximo de absorción del fotosensibilizador (desde el visible hasta el infrarrojo cercano) y oxígeno molecular (fig. 1b). Cuando el FS absorbe un fotón, pasa a un estado excitado en donde puede interaccionar con el oxígeno molecular ( $O_2$ ) generando radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a través del mecanismo tipo I (transferencia de cargas) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) por el mecanismo tipo II (transferencia de energía, fig 1c). Adicionalmente, el  $O_2^{\cdot-}$  puede reaccionar con el radical óxido nítrico (NO) para producir peroxinitrilo (OONO-, fig 1c), otra especie altamente reactiva con capacidad de oxidar grupos funcionales. Las especies generadas, tanto las especies reactivas del oxígeno (ERO) o del nitrógeno (ERN), pueden actuar sobre aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos de las biomoléculas produciendo finalmente la muerte celular por estrés oxidativo y nitrosativo, por lo que se espera una regresión de la lesión (fig 1d).

Se ha demostrado que antraquinonas (AQs) naturales reducen la viabilidad celular de promastigotas de *L. amazonensis* bioluminiscente a bajas concentraciones y con bajas dosis de irradiación.

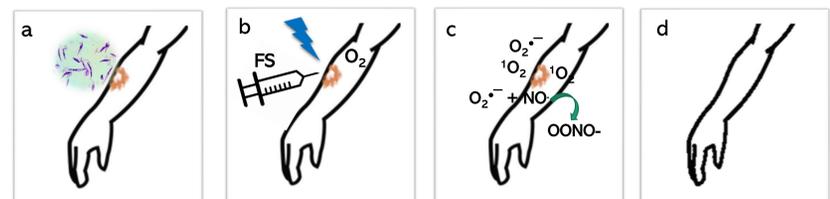


Fig.1 Secuencia de aplicación de la TFDAp.

### Hipótesis

Las AQs naturales con propiedades fotosensibilizantes tendrán efecto sobre diferentes especies de *Leishmania*, tanto sobre la forma promastigote como amastigote, mediante un mecanismo fotosensibilizante tipo 1 y/o tipo 2, que puede ir acompañado de un estrés nitrosativo. El estudio del mecanismo de acción de estas AQs, complementado con el estudio de su localización intracelular, sus efectos sobre los distintos componentes subcelulares y el estudio de la muerte por apoptosis y/o necrosis de los parásitos, nos permitirán arribar a resultados que permitan optimizar el efecto del FS en amastigotes y promastigotes de *Leishmania spp.*

### Metodología

1. Aislamiento y purificación de las AQs (fig 2).
2. Actividad antiparasitaria:
  - a. Evaluación de TFDAp en cultivos de promastigotas de *Leishmania amazonensis* y *braziliensis*.
  - b. Determinación de la citotoxicidad en macrófagos
  - c. Evaluación de TFDAp en amastigotes intracelulares de *Leishmania amazonensis* y *braziliensis*.
- El tratamiento de TFDAp será comparado con Anfotericina B (droga aprobada para el tratamiento de LC).
3. Determinación del mecanismo de acción fotodinámico de las AQs en *Leishmania braziliensis*.
4. Determinación del mecanismo de muerte de promastigotas de *Leishmania braziliensis*:
  - a. Co-localización de AQs con componentes subcelulares empleando inmunofluorescencia.
  - b. Efecto de la TFDAp en componentes subcelulares empleando inmunofluorescencia.
  - c. Evaluación de la muerte por apoptosis/necrosis a través de citometría de flujo.

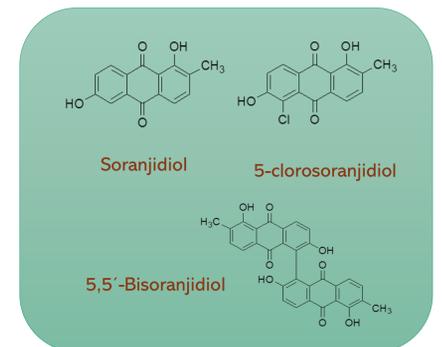


Fig. 2 Derivados antraquinónicos que poseen propiedades fotosensibilizadoras.

### Avances

Se realizó la puesta a punto de los cultivos celulares y de la técnica de Giemsa sobre promastigotes (fig. 3a) y amastigotes en co-cultivo con macrófagos (fig. 3b) de *L. amazonensis*.

Se determinó la susceptibilidad de *L. amazonensis* cepa (MHOM/VE/84/MEL) a Anfotericina-B ( $CE_{50}$ : 0,08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), el fármaco que será empleado como control positivo (gráfico 1). Además, se puso a punto la técnica de MTT empleando un control sin tratamiento, un control con DMSO al 50% (control positivo), otro control positivo con Anfotericina-B y se evaluaron dos AQs, soranjidiol (Sor) y Bisoranjidiol (Bisor) en oscuridad sin irradiación (gráfico 2).

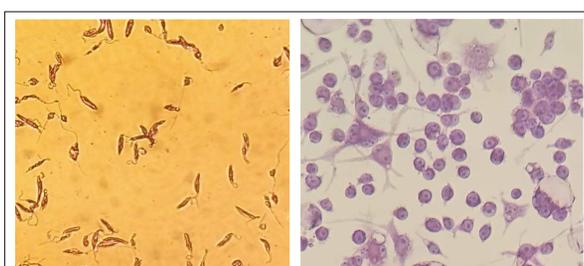


Fig. 3 Cultivos celulares de promastigotas (a) y amastigotas (b) de *L. amazonensis*.

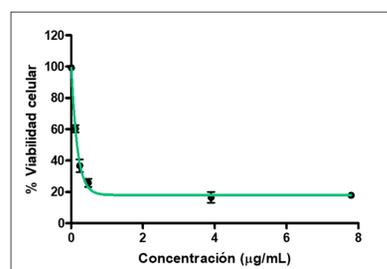


Gráfico 1: Susceptibilidad a Anfotericina-B de *L. amazonensis* cepa (MHOM/VE/84/MEL).

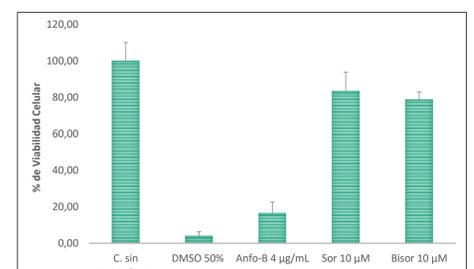


Gráfico 2: Determinación del porcentaje de viabilidad celular empleando la técnica del MTT.

### Importancia de la ciencia y la producción de conocimiento en el desarrollo estratégico del país

El presente proyecto se inscribe en la necesidad que desde organismos estatales se desarrollen nuevas terapias para las ED. Estas enfermedades están muy lejos de las prioridades de la investigación biomédica y farmacéutica mundial. De 1.556 nuevos fármacos aprobados en los últimos años, sólo el 1,3% han sido desarrollados específicamente para ED, incluyendo Chagas y leishmaniasis. Las ED causan el 90 % de la morbilidad global en el planeta, afectando a más de mil millones de personas en el mundo, la mitad de ellas niños, pero sólo consumen el 10% de los recursos destinados a la investigación. Las interrelaciones entre ciencia, tecnología y desarrollo social son muy importantes desde la perspectiva de los países subdesarrollados. El nuevo paradigma científico y tecnológico conectado al proceso de globalización plantea retos extraordinarios a los países del sur, específicamente en el desarrollo de conocimientos científicos que ayuden a resolver los graves problemas que nos aquejan.