

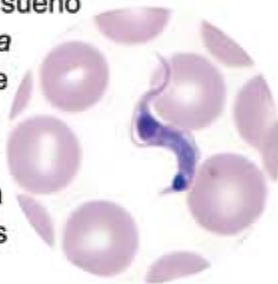
Estrategias en la búsqueda de agentes anti-tripanosomátidos

Andrea Medeiros^{1,2}, Diego Benítez², Lucía Fiestas², Diego Charquero², Marcelo Comini²

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U. de la República, Montevideo, Uruguay.

² Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos, Institut Pasteur de Montevideo.

La familia *Trypanosomatidae* está constituida por parásitos protozoarios causantes de la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) y del sueño (*Trypanosoma brucei*) y de las distintas manifestaciones de la Leishmaniasis (*Leishmania*



spp). De acuerdo a la OMS, el número de personas afectadas por estas enfermedades o en riesgo de contraerlas, asciende a varios millones (WHO, 2012). Los fármacos disponibles para tratar estas infecciones son poco eficaces, presentan alta toxicidad y resistencia, y las vías de administración requieren de hospitalización. El desarrollo de vacunas al momento no ha resultado exitoso debido a que los parásitos emplean mecanismos muy efectivos para evadir la respuesta inmune del huésped. Por lo tanto, la quimioterapia y la búsqueda de nuevas entidades farmacológicas más potentes y selectivas, continúa siendo la principal alternativa para combatir

estas enfermedades (Pink y col., 2005; Wyatt y col., 2011).

Las estrategias empleadas para la identificación de compuestos con potencial de desarrollarse como fármacos pueden dividirse en dos: (1) la basada en el cribado de compuestos por fenotipo (*phenotypic drug discovery*, PDD) en modelos celulares o animales y (2) otra basada en un blanco molecular específico (*target-based drug discovery*) donde los potenciales inhibidores son identificados aplicando técnicas de cribado *in vitro* (por ej. ensayos de actividad enzimática) o *in silico* (estos requieren de la estructura tridimensional de la proteína blanco).

Uno de los objetivos de nuestro grupo de investigación es contribuir a la identificación de nuevas entidades químicas que reduzcan de manera específica y significativa la viabilidad de tripanosomátidos patógenos, para lo cual hemos implementado ambas aproximaciones (Figura 1). Referente a la aplicación de la estrategia PDD, nuestro laboratorio ha

generado líneas celulares de tripanosomátidos (*T. brucei* y *T. cruzi*) transfectadas de manera estable con distintos biosensores redox (rxYFP y roGFP2, respectivamente) (Sardi y Comini, en preparación). Una de las aplicaciones tecnológicas que pretendemos darle a dichas líneas reporteras es su uso como herramienta exploratoria del mecanismo de acción de compuestos en campañas de cribado. Por tanto, hemos analizado la actividad biológica contra la forma infectiva de *T. brucei* de aproximadamente 500 compuestos, con gran diversidad química (entre ellos análogos de aeruciclamidas, complejos de metales, paulonas, benzofuroxanos y oxiquinolinas, piridopirimidinas, derivados de diaminas) sintetizados por colaboradores uruguayos (Dras. G. Serra y D. Gambino, Fac. de Química, U. de la República) y del exterior (grupos del Consorcio Europeo COST CM0801 y CM1307, Dr. G. Labadie, IBR Rosario-Argentina, Dr. R. Pilli, Universidad de Campinas-Brasil y la empresa Design Medix-USA).

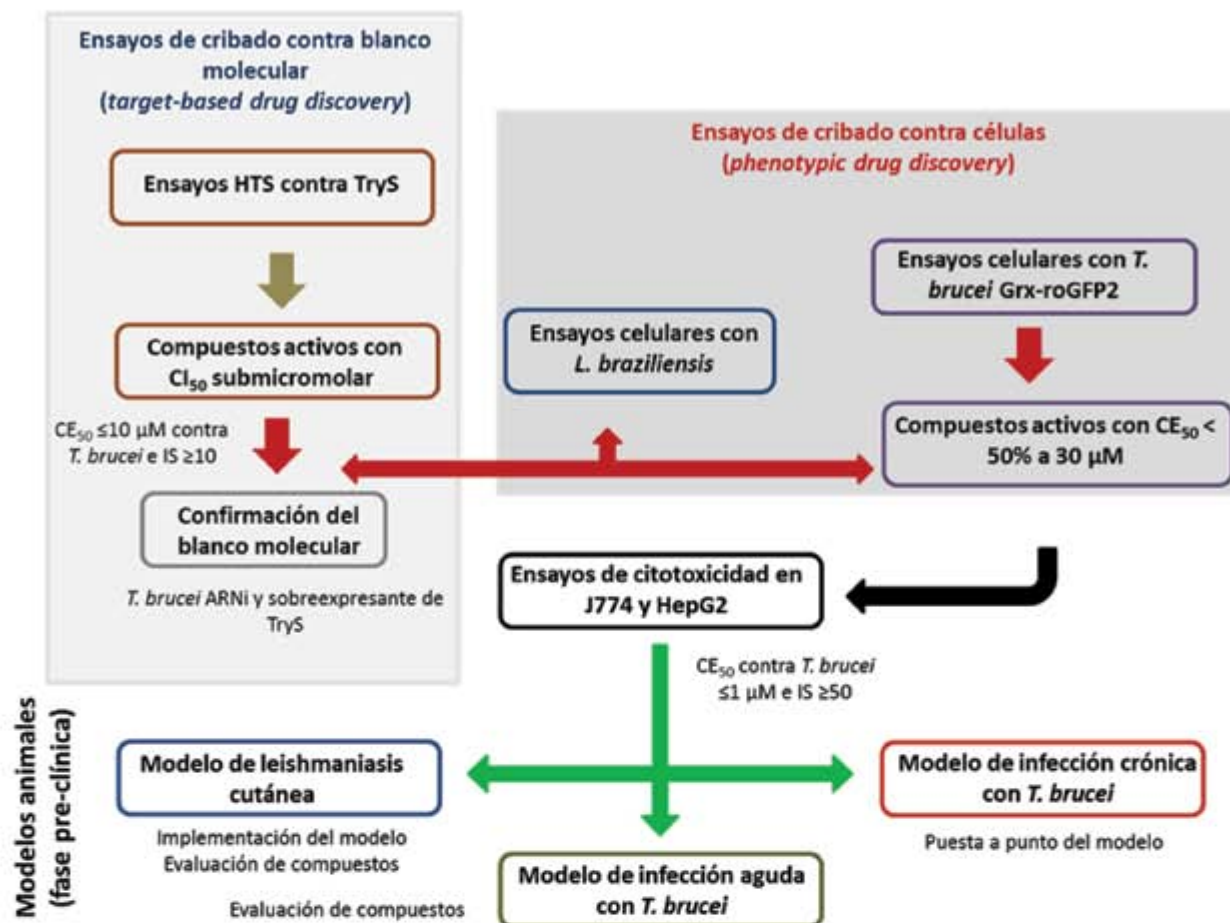


Figura 1. Esquema simplificado de actividades de descubrimiento de fármacos y modelos usados por nuestro laboratorio. Las estrategias usadas en la identificación de nuevas entidades químicas con potencial anti-tripanosomático consisten en el cribado contra un blanco específico, la tripanotión sintetasa (TryS; sobre fondo gris claro) y el cribado sobre líneas celulares *T. brucei* y contra *L. braziliensis* (sobre fondo gris oscuro). La selectividad de los compuestos se analiza en líneas celulares de mamífero (macrófagos murinos: J774 y hepatocitos: HepG2, recuadro negro superior). Los compuestos que superen este test avanzan a las evaluaciones de eficacia terapéutica en el modelo murino de infección aguda con *T. brucei* (recuadro verde) y, una vez establecidos, en los de leishmaniasis cutánea con *L. braziliensis* (recuadro azul) e infección de sistema nervioso central por *T. brucei* (recuadro rojo). Se muestran en cada caso los criterios que se tendrán en cuenta.

Esta estrategia ha permitido la identificación de varios compuestos capaces de inhibir el crecimiento del patógeno en concentraciones micromolares bajas (Peña y col., 2012; Demoro y col., 2012; Fernández y col., 2013; Peña y col., 2014) a submicromolares (Maiwald y col., 2014) y, en algunos casos, con una marcada selectividad contra *T. brucei* (por ej. la citotoxicidad contra parásitos infectivos fue dos

órdenes de magnitud superior a la detectada contra macrófagos murinos). Por otro lado, el uso de la línea celular reportera de cambios redox nos permitió indagar sobre el potencial mecanismo de acción de los compuestos. Por ejemplo, durante la campaña de cribado se identificaron varios compuestos con actividad citotóxica en el orden $\leq 10 \mu M$, la cual estuvo asociada a una marcada disminución de la intensidad

de fluorescencia del biosensor (30 a 50%), lo cual sugiere que estos compuestos podrían estar actuando sobre algún componente del metabolismo redox dependiente de tioles de este organismo.

En relación a la estrategia basada en la identificación de inhibidores de un blanco molecular específico, nuestros esfuerzos se centran en la enzima tripanotión sintetasa (TryS) la cual es responsable de

sintetizar tripanotión (bis-glutationilpermidina), el principal cofactor redox de bajo peso molecular de estos organismos. El interés por la TryS reside en su demostrada indispensabilidad para *T. brucei* (Comini y col., 2004; Wyllie y col., 2009) y, recientemente, para *L. infantum* (Sousa y col., 2014), así como su carácter exclusivo de organismos del Orden Kinetoplástida, al cual pertenecen los tripanosomátidos (Manta y col., 2013b). Otras características adicionales que la destacan como una atractiva diana molecular son su concentración intracelular baja (<5 μM) en *T. brucei*, *T. cruzi* (Fiestas y col., no publicado) y *L. infantum* (Sousa y col., 2014) y el ser codificada por un gen de copia única, indicadores favorables para evitar la generación de resistencia. La TryS ha sido recientemente validada como blanco terapéutico en modelos de infección animal para *T. brucei* (Torrie y col., 2009). Por otro lado, se cuenta con una caracterización cinética de TryS de diferentes especies (Oza y col., 2002; Oza y col., 2003; Oza y col., 2005; Comini y col., 2005; Koch y col., 2013; Leroux y col., 2013), y datos estructurales de la TryS de *L. major* (Fyfe y col., 2008) que generan información valiosa para el diseño racional de compuestos contra TryS.

Referente a la identificación de potenciales inhibidores de TryS, recientemente se ha llevado a cabo un cribado de alta procesividad (*high-through put screening*: HTS) contra TryS de *T. brucei* empleando una librería de ~62000 compuestos que permitió identificar *hits* con CI_{50} del orden de

50-140 nM y valores de CE_{50} del orden de 5-10 μM en la forma infectiva de *T. brucei* (Torrie y col., 2009; Wyllie y col., 2009; Spinks y col., 2012). En esta misma línea de trabajo, nuestro laboratorio ha establecido un ensayo HTS para detectar inhibidores contra las formas recombinantes de la TryS de los patógenos *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. infantum*. Esto permitió el cribado y análisis de una quimioteca de aproximadamente 500 compuestos (24 series diferentes) entre los cuales se identificaron compuestos con actividad inhibitoria de TryS de *L. infantum* en el orden nanomolar (Sousa y col., 2014) y micromolar baja para las enzimas de *T. brucei* y *T. cruzi* (Benítez y col., en preparación). Esta estrategia también permitió detectar varios prototipos químicos con potencial para ser optimizados como inhibidores multi-TryS.

La identificación de farmacóforos es un proceso largo y complejo que involucra diferentes etapas de tamizaje y validación de candidatos mediante una batería de ensayos bioquímicos y celulares, que superados podrían dar lugar a evaluaciones de eficacia terapéutica en modelos de infección animal (fase pre-clínica). Para evaluar la eficacia terapéutica de fármacos o compuestos contra la tripanosomiasis Africana, así como realizar estudios de funcionalidad de genes (como validación de blancos terapéuticos), nuestro laboratorio ha establecido exitosamente un modelo agudo de infección en ratones por *T. brucei brucei* (Roldán y col., 2011, Manta y col., 2013a; Hiller y col., 2014) sobre el cual se estudió el efecto

de agentes quelantes (Manta y col., 2012).

Además nos planteamos a corto plazo realizar estudios de terapia anti-parasitaria en el estadio neurológico de la tripanosomiasis Africana humana que resulta la forma más grave que ocurre en humanos (Bouteille y col., 1999) empleando un modelo murino de esta enfermedad (Keita y col., 1997).

En la búsqueda de compuestos que puedan usarse como tratamiento multi-enfermedad en áreas multi-endémicas como es el caso de tripanosomiasis y leishmaniasis, actualmente estamos extendiendo los estudios de evaluación de actividad biológica de los compuestos más activos contra *T. brucei* y la TryS de *L. infantum*, al agente regional causante de la leishmaniasis mucocutánea, *Leishmania braziliensis*. Nuestro grupo ha iniciado recientemente una colaboración con la Dra. C. I. de Oliveira (Laboratorio de Inmunoparasitología- Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (CPqGM)-FIOCRUZ de Salvador de Bahía) en el marco de la cual se están evaluando dichos compuestos en modelos de infección celular y animal por *L. braziliensis* (Oliveira y col., 2004; Moura y col., 2005).

Los resultados de estos estudios nos permitirán identificar moléculas con propiedades farmacológicas que en el futuro podrían ser aplicadas al mejoramiento de las opciones terapéuticas para tratar las enfermedades causadas por parásitos tripanosomátidos.

Referencias:

- Bouteille, B y col. 1999. Experimental models for new chemotherapeutic approaches to human African trypanosomiasis in Progress in Human African Trypanosomiasis, Sleeping Sickness. M. Dumas y col. (eds). Springer-Verlag France p:289.
- Comini, M y col. 2004. Validation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase as drug target. Free Rad. Biol. Med. 36:1289.
- Comini, MA y col. 2005. Trypanothione Synthesis in Crithidia Revisited. J. Biol. Chem. 280:6850.
- Demoro, B y col. 2012. New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential antitrypanosomal agents. Dalton Trans. 41:1534.
- Fernández, M y col. 2013. Oxidovanadium(IV) and dioxidovanadium(V) complexes of tridentate salicylaldehydesemicarbazones: searching for prospective antitrypanosomal agents. Journal of Inorganic Biochemistry. 127:150.
- Fyfe, PK y col. 2008. Leishmania Trypanothione Synthetase-Amidase Structure Reveals a Basis for Regulation of Conflicting Synthetic and Hydrolytic Activities. J. Biol. Chem. 283:17672.
- Hiller, C y col. 2014. Cytosolic Peroxidases Protect the Lysosome of Bloodstream African Trypanosomes from Iron-Mediated Membrane Damage. PlosPathogen. 10 e1004075.
- Keita, M y col. 1997. *Trypanosoma brucei brucei*: A Long-Term Model of Human African Trypanosomiasis in Mice, Meningo-Encephalitis, Astrocytosis, and Neurological Disorders. Experimental Parasitology. 85:183.
- Koch, O y col. 2013. Molecular Dynamics Reveal Binding Mode of Glutathionylspermidine by Trypanothione Synthetase. PloS One. 8:56788.
- Leroux, AE y col. 2013. Dissecting the Catalytic Mechanism of *Trypanosoma brucei* Trypanothione Synthetase by Kinetic Analysis and Computational Modelling. J. Biol. Chem. 288:23751.
- Manta, B y col. 2012. Iron metabolism in pathogenic Trypanosomes, In: Iron Metabolism. Ed. ISBN 979-953-307-162-5. INTECH.
- Manta, B y col. 2013a. Iron-Sulfur Cluster Binding by Mitochondrial Monothiol Glutaredoxin-1 of *Trypanosoma brucei*. Molecular Basis of Iron-Sulfur Cluster Coordination and Relevance for Parasite Infectivity. Antioxid Redox Signal. 19:665.
- Manta, B y col. 2013b. Trypanothione: A unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. BiochimBiophysActa. 1830:3199.
- Maiwald, F y col. 2014. 9- and 11-substituted 4-azapaulones are potent and selective inhibitors of African trypanosoma. Eur J. Med. Chem. 83:274.
- Moura, TR y col. 2005. Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. Infection and Immunity. 73:5827.
- Oliveira, CI y col. 2004. *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. Microbes and Infection. 6:977.
- Oza, SL y col. 2002. A Single Enzyme Catalyses Formation of Trypanothione from Glutathione and Spermidine in *Trypanosoma cruzi*. The Journal of Biological Chemistry. 277:35853.
- Oza, SL y col. 2003. Properties of trypanothione synthetase from *Trypanosoma brucei*. Molecular and Biochemical Parasitology. 131:25.
- Oza, SL y col. 2005. Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. Molecular and Biochemical Parasitology. 139:107.
- Peña, S y col. 2012. Synthesis of precursors and microcycle analogs of aerucyclamodes as anti-trypanosomal agents. MedChemComm. 3:1443.
- Peña, S y col. 2014. Synthesis of Cyclohexapeptides as Antimalarial and Anti-trypanosomal Agents. MedChemComm. 5:1309
- Pink, R y col. 2005. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. Nat. Rev. Drug Discovery. 4:727.
- Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. 2012. Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis (Technical report series; no. 975), WHO.
- Roldán, A y col. 2011. Lipoamide dehydrogenase is essential for both bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. MolMicrobiol. 81:623.
- Sousa, AF y col. 2014. Genetic and Chemical Analyses Reveal that Trypanothione Synthetase but Not Glutathionylspermidine Synthetase Is Essential for *Leishmania infantum*. FRBM. 73:229.
- Spinks, D y col. 2012. Design, Synthesis and Biological Evaluation of *Trypanosoma brucei* Trypanothione Synthetase Inhibitors. Chem-MedChem. 7: 95.
- Torrie, LS y col. 2009. Chemical validation of trypanothione synthetase. A potential drug target for human trypanosomiasis. J. Biol. Chem. 284:36137.
- Wyatt, PG y col. 2011. Target validation: linking target and chemical properties to desired product profile. Curr. Topics Med. Chem. 11:1275.
- Wyllie, S y col. 2009. Dissecting the essentiality of the bifunctional trypanothione synthetase-amidase in *Trypanosoma brucei* using chemical and genetic methods. Mol. Microbiol. 74:529.