

## Valoración de la actividad biológica de nuevas formulaciones farmacéuticas de nifurtimox y anfotericina B

Rolón M<sup>1</sup>, Serrano D<sup>2</sup>, Vega C<sup>1</sup>, Miret J<sup>3</sup>, Dea MA<sup>4</sup>, Lalatsa, A<sup>5</sup>, Salvioni, O<sup>1</sup>, Gonzalez MA<sup>1</sup>, Cordeiro-Giunchetti R<sup>6</sup>, Rojas de Arias A<sup>1</sup>

### PROGRAMA PROCIENCIA – CONVOCATORIA 2013 - PROYECTO 14-INV-022

#### RESUMEN

Los fármacos utilizados contra la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis están asociados a severos efectos secundarios. El desarrollo de nuevas drogas activas o mejorar las existentes constituye una necesidad prioritaria. Por este motivo, este proyecto desarrollo 7 nuevas formulaciones SNEDDS de nifurtimox y una formulación de microesferas de albumina de anfotericina B para ser ensayados *in vitro* e *in vivo* contra *T. cruzi* y *Leishmania sp*, respectivamente. De las 7 formulaciones NfxS, 3 fueron activas *in vitro* y una de ellas fue ensayada *in vivo* con una actividad parasitaria del 100%. La nueva formulación Anfo Bma fue un tratamiento intravenoso en 6 perros naturalmente infectados con *L. infantum* y solo 1 de ellos presento cura parasitológica.

#### INTRODUCCIÓN

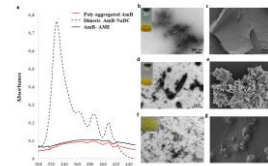
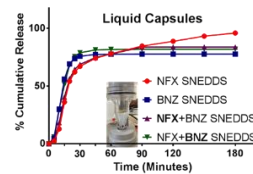
La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) es endémica en América Latina, se estima que 90 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad y 8 millones de personas están infectadas en 18 países endémicos. Los fármacos utilizados actualmente, Nifurtimox (Lampit) y Benznidazol (Radanil), son tóxicos, de eficacia solo en la fase aguda y el tratamiento es prolongado. Desde la pasada década, los transportadores coloidales, como liposomas y polímeros biodegradables han sido considerados como una forma de lograr una mayor especificidad de antiparasitarios comúnmente utilizados, limitando su toxicidad sin comprometer su eficacia. No existen muchos trabajos realizados con los fármacos de referencia utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, dentro de sistemas de soporte-liberación, solo dos en nifurtimox y en benznidazol liposomas y microesferas.

La leishmaniosis es una infección causada por más de 20 especies de protozoarios patógenos del género *Leishmania sp* transmisible a los humanos a través de la picadura de mosquitos de la sub-familia Phlebotominae. Al igual que en humanos, el tratamiento de la leishmaniosis canina continúa siendo problemático ya que los fármacos antimoniales, la anfotericina B y la paramomicina tienen eficacia limitada y alta toxicidad. Por todo lo expuesto, este proyecto planteo obtener y ensayar nuevas formulaciones farmacéuticas de nifurtimox y anfotericina B, que presenten características de encapsulamiento conveniente, solubilidad, estabilidad y disolución adecuadas para desarrollar ensayos preclínicos que nos permitan obtener una alternativa terapéutica más efectiva para la enfermedad de Chagas y las Leishmaniosis visceral humana y canina.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

1- Nuevas formulaciones farmacéuticas: 1A- Nifurtimox: formulaciones lipídicas SNEDDS. 1B- Anfotericina B: microesferas de albúmina. 2- Toxicidad *in vitro* de nifurtimox y anfotericina B en células de mamíferos. Toxicidad *in vivo* de nifurtimox en ratones Balb/c y de anfotericina b en perros naturalmente infectados con *L. infantum*. 3- Eficacia *in vitro* e *in vivo* de nifurtimox en *T. cruzi*, diagnóstico de ELISA y detección de parásitos por PCR. 4- Eficacia *in vitro* e *in vivo* de anfotericina b en *L. infantum*. *In vitro* en cepas de referencias y locales. *In vivo* en 6 perros: 3 dosis (5 mg/kg/cada 15 días) vía intravenosa de anfotericina B vehiculada en microesferas de albúmina con evaluación clínica, hematológica, bioquímica, inmunológica, carga parasitaria en médula ósea por qPCR antes del tratamiento y a los 2, 6 y 12 meses post tratamiento.

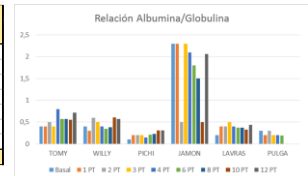
#### RESULTADOS



#### 1A- SNEDDS nifurtimox

Compuestos	IC50 T. cruzi ug/mL	IC50 ug/mL NCTC929	IC50 ug/mL J774	IS NCTC	IS J774
1	0,02	0,1	0,1	6	5
2	0,02	0,1	0,2	5	7
3	0,60	0,7	0,4	1	1
4	0,40	1,3	0,3	3	1
5	0,03	0,8	0,5	28	17
6	0,30	1,5	0,7	5	2
7	0,20	0,8	0,4	4	2
Nifurtimox	5,5	88,3	95,5	16	17

#### 1B- Microesferas de anfotericina B



#### 2A y 3A Efectividad y citotoxicidad *in vitro* de SNEDDS de nifurtimox

MÉTODO CLÁSICO TOXICIDAD AGUDA EN RATONES			
Compuestos 200 µg/mL	Raton 1	Raton 2	Raton 3
N1	+	+	+
N3	-	-	-
N5	-	-	-

#### 2B Toxicidad *in vivo* de anfotericina B

#### 2B Toxicidad *in vivo* de SNEDDS de nifurtimox

DIA DE PARASITEMIA	% Reducción de parasitemia							
	SNEEDS NIFU 25 + BENZ 50	SNEEDS NIFU 12,5 + BENZ 25	SNEEDS BENZ 100	SNEEDS BENZ 50	BENZ 50	SNEEDS BENZ 25	NIFU 50	SNEEDS
8 dpi	100	100	100	100	100	100	88	7
10 dpi	100	100	100	100	100	94	99	20

#### 3B- Eficacia de nifurtimox *in vivo*

Compuestos	IC <sub>50</sub> µM			Concentración inhibitoria media (IC50) y citotoxicidad media (CC50) de las formulaciones de anfotericina B frente a promastigotes de <i>L. infantum</i> , <i>L. brasiliensis</i> y células J774		
	Promastigotes <i>L. braziliensis</i>	Promastigotes <i>L. infantum</i>	Promastigotes <i>Leishmania sp</i> (W1)	Parasitos en microesferas	IC50 (µg/ml)	CC50 (µg/ml)
Anfo B	0,1	0,2	0,2	1,82	0,56	27,2
Microesferas Anfo B	0,2	0,3	0,3	Fungicida*	0,46	12,43

#### 2A y 4A- Eficacia y citotoxicidad de anfotericina B *in vitro*

Nombre	Código	Muestra	PCR cuantitativa								
			Basal	1 PT	2 PT	3 PT	4 PT	6 PT	8 PT	10 PT	12 PT
Willy	WI3	Lesión cutánea	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Pichi	PI6	Ganglio	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tomy	TO7	Ganglio	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Jamón	JA9	Ganglio	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lavras	LA10	Ganglio	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pulga	PU11	Ganglio	+	+	+	+	+	+	+	+	+

#### 4B- Eficacia de anfotericina B *in vivo*

**CONCLUSIONES:** La nueva formulación SNEDDS de nifurtimox fue efectiva en *T. cruzi* y la nueva formulación de microesferas de albumina de anfotericina B fue efectiva hasta el quito mes post-tratamiento en perros naturalmente infectados con *Leishmania sp*.