

Resumen #583

ESTUDIO IN VITRO DE LA COMBINACIÓN DE ANFOTERICINA-B Y CLOMIPRAMINA SOBRE *Leishmania braziliensis*

¹Amelia E, ²Lozano E, ³Konigheim B, ³Aguilar JAVIER, ¹Lo Presti S, ¹Bazan C, ¹Strauss M, ¹Rivarola W

¹Centro de Estudios e Investigación de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba; ²Universidad Nacional de Cuyo; ³Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella, FCM,UNC

Persona que presenta:

Amelia E, enzo_amelia@hotmail.com

Área:

Básica

Resumen:

La Anfotericina-B (ANF), fármaco de uso habitual para el tratamiento de Leishmaniasis, producida por protozoarios del género *Leishmania*, ejerce su actividad a partir de su unión con el ergosterol de las membranas del parásito, interfiriendo en su permeabilidad con la consiguiente pérdida de iones que lleva a la lisis de su membrana, produciendo la muerte del parásito. Sin bien, este fármaco produce un efecto leishmanicida, a menudo es tóxico para los pacientes. Debido a esto, se propuso la búsqueda de nuevos fármacos que actúen sobre blancos moleculares presentes en el parásito y ausentes en el huésped. Clomipramina (CLO), un antidepresivo tricíclico, es un potente inhibidor de la tripanotona reductasa, enzima exclusiva del orden Kinetoplastide. El objetivo del presente trabajo fue analizar el tratamiento combinado *in vitro* de ANF y CLO sobre promastigotes de *L. braziliensis*. Realizamos un ensayo de citotoxicidad (MTT) sobre la línea celular Vero, incubando $2,5 \times 10^5$ cel/mL con ANF=25-400 µg/mL y CLO=25-1000 µg/mL, por 4 días, y un ensayo de efecto combinado en el que se incubaron 3×10^6 promastigotes/mL con ANF=0,002-0,032 µg/mL y CLO=0,3-2 µg/mL. Determinamos los valores de la concentración inhibitoria del 50% (IC50) y evaluamos el efecto de la combinación calculando el Índice de Combinación (CI: CI>1 antagónico; CI=1 aditivo; CI<1 sinérgico) y se graficaron isobologramas con los valores de IC50 de cada una de las drogas y de las combinaciones. El IC50 de ANF fue de 0,018 µg/ml y de CLO 1,098 µg/ml sobre promastigotes, siendo 25 y 108 veces menor que la concentración citotóxica. Los valores de IC50 sobre la línea celular Vero fueron 0,44 µg/ml para ANF y 119 µg/ml para CLO. El valor del CI fue de 0,18 indicando un efecto marcadamente sinérgico. En los isobologramas los valores de IC50 de las combinaciones se ubicaron debajo de la línea de aditividad, indicando un efecto sinérgico entre ANF y CLO, coincidiendo con el resultado obtenido con el índice de combinación. El efecto sinérgico observado sería el resultado de los mecanismos de acción complementarios de ambas drogas, potenciando su efecto letal, produciendo la muerte del parásito a menores concentraciones que la monoterapia y sin efectos tóxicos evidentes sobre el huésped.

Palabras Clave:

Leishmaniasis, tratamiento, anfotericina-B, clomipramina

IN VITRO STUDY OF AMPHOTERICIN-B AND CLOMIPRAMINE COMBINATION UPON *Leishmania braziliensis*

¹Amelia E, ²Lozano E, ³Konigheim B, ³Aguilar JAVIER, ¹Lo Presti S, ¹Bazan C, ¹Strauss M, ¹Rivarola W

¹Centro de Estudios e Investigación de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba; ²Universidad Nacional de Cuyo; ³Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella, FCM,UNC

Persona que presenta:

Amelia E, enzo_amelia@hotmail.com

Abstract:

The synergistic effect observed would be the result of the complementary mechanism of action of both drugs, enhancing their lethal effect, causing the death of the parasite at lower concentrations than in monotherapy and without noticeable toxic effects on the host. Amphotericin-B (AMPHO), a commonly used drug for the treatment of Leishmaniasis, a produced by *Leishmania* protozoans, which exerts its activity attaching to the ergosterol of the parasite's membrane, interfering with its permeability with the consequent loss of ions leading to the membrane lysis and the death of the parasite. However, the parasitocidal effect of this drug is often toxic to the patient. Because of this, the search for new drugs focused on molecular targets that are present on the parasite and absent in the host has been proposed. Clomipramine (CLO), a tricyclic antidepressant, is a potent inhibitor of trypanothione reductase, an enzyme exclusive to the Kinetoplastida order. The aim of the current work was to analyze the *in vitro* combined treatment of AMPHO and CLO upon *L. braziliensis* promastigotes. We performed a cytotoxicity assay (MTT) on the Vero cell line, by incubating 2.5×10^5 cells/mL with AMPHO = 25 – 400 µg/mL and CLO = 25 – 1000 µg/mL for 4 days, and a combined effect assay in which 3×10^6 promastigotes/mL were incubated with AMPHO = 0.002-0.032 µg/mL and CLO = 0.3-2 µg/mL. We determined the 50 % inhibitory concentration (IC₅₀) values and assessed the combination effect by calculating the Combination Index (CI: CI > 1 antagonist, CI = 1 additive, CI < 1 synergist); isobolograms using the IC₅₀ values of each drug and combinations were graphed. IC₅₀ values were 0.018 µg/mL for AMPHO and 1.098 µg/mL for CLO upon promastigotes, which were 25 and 108 times lower than the cytotoxic concentration, respectively. IC₅₀ values upon Vero cells were 0.44 µg/mL for AMPHO and 119 µg/mL for CLO. CI value was 0.18 indicating a markedly synergistic effect. IC₅₀ values of the combinations were located below the additivity line in the isobolograms, indicating a synergistic effect between AMPHO and CLO, as found with the combination index. The synergistic effect observed would be the result of the complementary mechanism of action of both drugs, enhancing their lethal effect, causing the death of the parasite at lower concentrations than in monotherapy and without noticeable toxic effects on the host.

Keywords:

Leishmaniasis, treatment, Amphotericin-B, clomipramine