

TESIS DOCTORALES

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS ANTIMALÁRICOS CON CAPACIDAD DE BLOQUEAR LA TRANSMISIÓN DE LA MALARIA

La malaria es la enfermedad parasitaria más importante del mundo. Se conoce desde muy antiguo, pero no fue hasta finales del siglo XIX cuando se descubrió que estaba causada por un protozoo del género *Plasmodium*.

Este género comprende más de 175 especies de las cuales fundamentalmente 5 son capaces de infectar al ser humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*. La primera de ellas es la que causa las formas de malaria más severas mientras que la segunda es la que se encuentra más ampliamente distribuida. El trabajo de esta tesis se ha realizado sobre la especie *P. falciparum*.

La malaria se extiende por una gran parte del mundo pero el África subsahariana es el lugar donde hay una mayor densidad de casos (188 millones de personas afectadas y 395000 muertes en 2015). Casi el 100% de los casos en África están causados por *P. falciparum*.

En 1898, Ronald Ross describió por primera vez el ciclo vital de *Plasmodium*. Este ciclo discurre en dos ámbitos: el huésped (ser humano) y el vector (hembra del mosquito *Anopheles*). El ciclo es muy complejo y el parásito atraviesa por diferentes estadios con distinto metabolismo, expresión de antígenos y morfología. La parte del ciclo que causa los síntomas al paciente se denomina ciclo asexual intraeritrocítico mientras que las formas sexuales del parásito causan la transmisión del parásito a otros huéspedes.

Nuestra investigación se dirigió a la búsqueda de nuevas moléculas con actividad frente a los gametocitos maduros, estadio V, verdaderos responsables de la transmisión de la enfermedad (Figura 1).

La terapia actual para el paludismo está compuesta por moléculas que pertenecen a diferentes familias anti-maláricas entre las que figuran: antagonistas de folato, atovaquona, 4-aminoquinolinas, aminoalcoholes,

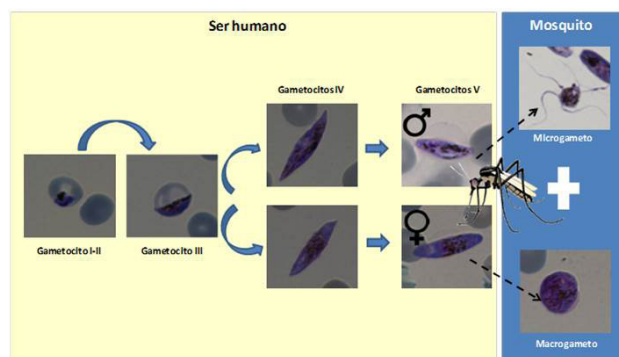


Figura 1. Estadios de maduración de los gametocitos (I-V) en el ser humano. Activación de los gametocitos a gametos en el interior del mosquito tras la picadura.

8-aminoquinolinas, endoperóxidos y antibióticos que actúan sobre el apicoplasto. Aún no se dispone de una vacuna efectiva si bien las inversiones de los últimos años han permitido que 40 proyectos se encuentren en diferentes fases de desarrollo, siendo el más avanzado Mosquirix que se halla en fase IV (GlaxoSmithKline).

Debido a la emergencia de resistencias frente a los fármacos anteriores no se recomienda el uso en solitario de ninguno de ellos. Actualmente los antimaláricos se prescriben en combinaciones de productos con diferente mecanismo de acción lo que disminuye la probabilidad de aparición de nuevas resistencias.

Además del problema que supone la aparición de resistencias, se añade que la única molécula que se emplea en clínica y que tiene actividad frente a gametocitos, primaquina (8-aminoquinolina) presenta un grave problema de toxicidad ya que produce hemólisis en personas con deficiencia en el enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Ante esta situación, es urgente el descubrimiento de fármacos con mecanismos de acción novedosos, que puedan sustituir en la clínica a aquellos frente a los que han aparecido resistencias, así como que tengan actividad frente a gametocitos y consigan bloquear la transmisión de la malaria, en resumen compuestos con actividad dual. Esto condujo a la determinación de los objetivos de esta tesis:

1. Desarrollo de un nuevo método para el descubrimiento de fármacos con potencial acción sobre la transmisión de la enfermedad.

2. Estudio de actividad frente a gametocitos de la colección TCAMS (“Tres Cantos Antimalarial Set”).
3. Influencia de las condiciones experimentales en los ensayos de viabilidad.

En todo el trabajo de investigación, las muestras biológicas humanas fueron éticamente obtenidas y su uso en investigación se realizó en acuerdo con los términos de los consentimientos informados. Los consentimientos informados escritos fueron obtenidos de los donantes de sangre para el uso de las muestras en esta investigación.

En el momento de comenzar el trabajo presentado, la única técnica para valorar el efecto de nuevos compuestos frente a gametocitos estaba basada en la observación al microscopio de extensiones de gametocitos tratados. Este método no permite el cribado eficaz de alto número de compuestos y el reto que presentaba la enfermedad exigía con urgencia una nueva metodología que permitiera a los investigadores ensayar un alto número de compuestos con rapidez.

Se desarrolló un nuevo método para medir la viabilidad de los gametocitos basado en su contenido de ATP. Los gametocitos se produjeron *in vitro* y se purificaron mediante un procedimiento de dos pasos que consiguió eliminar todos los eritrocitos que los acompañan en el cultivo. Este paso fue necesario ya que el ATP procedente de los glóbulos rojos enmascara las variaciones de ATP de los gametocitos.

La cantidad de ATP es clave para el desarrollo de la siguiente reacción utilizada como lectura (Figura 2).

El ensayo fue validado farmacológicamente mediante la comparación de los resultados para una selección de 6 compuestos pertenecientes a diferentes familias antimaláricas mediante microscopía y contenido de ATP. Los resultados obtenidos fueron muy similares en ambos casos quedando la metodología validada.

Posteriormente, se empleó el nuevo método bioluminiscente de ATP para estudiar la actividad frente a gametocitos de un total de 16 compuestos antimaláricos ya

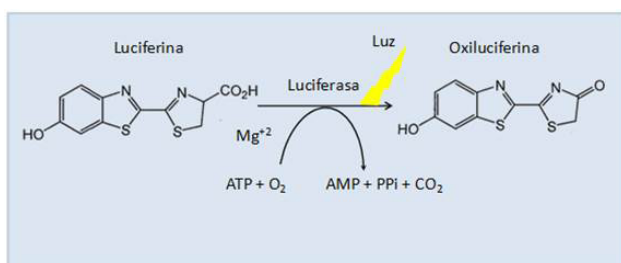


Figura 2. Reacción bioluminiscente para determinar el contenido de ATP de los gametocitos viables.

conocidos. Sólo dos compuestos manifestaron actividad *in vitro* frente a los gametocitos: epoxomicina y azul de metileno, pero ambos resultaron tóxicos en células de mamífero por lo que su aplicación en clínica no es posible.

Las ventajas del método bioluminiscente de ATP se pueden resumir así: es un método sensible y representativo de toda la muestra, la lectura es objetiva y rápida, no se necesitan cepas transgénicas y se escaló a un formato de placas de 384 pocillos lo que nos permitió afrontar el siguiente objetivo del trabajo que consistió en el cribado de una gran colección de compuestos: TCAMS.

Esta colección de compuestos procede del cribado en célula entera realizado por GlaxoSmithKline frente a su propia colección de 2 millones de moléculas. Tras el cribado frente a las formas asexuales del parásito se identificaron más de 13000 moléculas capaces de inhibir más del 80% al parásito a concentraciones inferiores a 2 μM. Este grupo de moléculas constituye el TCAMS y fue la colección elegida para ensayar frente a gametocitos. Estos compuestos se hicieron públicos y la información relativa a ellos se puede encontrar en el siguiente enlace: https://www.ebi.ac.uk/chemblntd/download/#tcams_dataset_tb.

El procedimiento seguido para la selección de compuestos del TCAMS con actividad frente a gametocitos se describe en el esquema de la Figura 3. Consistió en la aplicación sucesiva de filtros cada vez más exigentes para seleccionar las moléculas más prometedoras.

En primer lugar se aplicaron filtros biológicos que nos permitieron seleccionar un total de 98 compuestos que fueron posteriormente priorizados en función de sus propiedades físico-químicas quedando reducida la lista a un total de 56 moléculas (Figura 4). En base a estos productos se realizó un estudio de sus análogos activos en el entorno del TCAMS mediante dos aproximaciones quimioinformáticas: Búsqueda Computacional de Análogos basada en la Similitud (CSA) e Indexación de compuestos en Química Médica basada en Subestructuras (MCSI).

De esta lista de compuestos se seleccionaron 6 con diferentes estructuras químicas y valores de IC₅₀ frente a gametocitos para ser ensayados en un método que hace uso del mosquito alimentado con eritrocitos infectados con formas sexuales del parásito “Standard Membrane Feeding Assay (SMFA)” como método de validación del

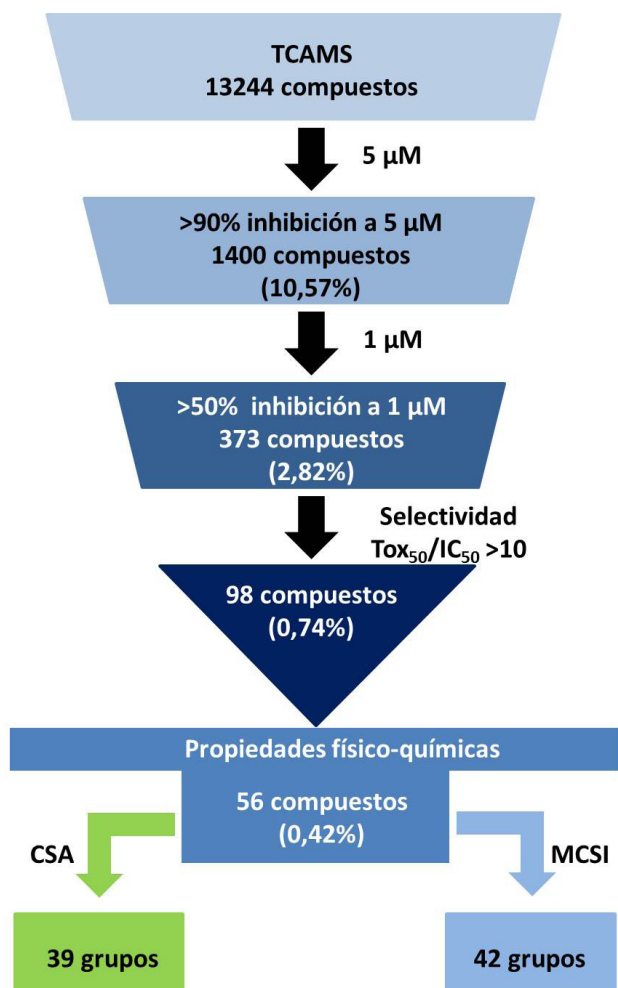


Figura 3. Descripción de los pasos críticos seguidos para identificar y priorizar compuestos positivos a partir del TCAMS.

potencial de bloqueo de la transmisión detectado por el método de viabilidad de ATP. Todos los compuestos ensayados inhibieron el 100% de formación de ooquistes en el mosquito reforzando el valor predictivo del ensayo bioluminiscente de ATP.

Una vez determinados los compuestos del TCAMS priorizados por su perfil físico-químico y actividad frente a gametocitos de *P. falciparum* se procedió a comparar estos resultados con los obtenidos por otros equipos de investigación que habían ensayado otra colección llamada Malaria Box que contiene 140 compuestos en común con el TCAMS.

La falta de concordancia entre los resultados presentados por los grupos estudiados entre sí y con los generados en nuestro equipo, nos condujo al desarrollo del tercer objetivo en el que se estudió el efecto de las diferentes condiciones experimentales sobre los resultados de los ensayos de viabilidad.

Compound TCAMS ID	IC ₅₀ (μM)		
	Pf Gametocytes	Pf Asexual stages	Cytotoxicity HepG2
TCMDC-125520	<0.0098	0,72	13
TCMDC-125769	0,04	1,00	>25
TCMDC-124436	0,11	0,40	>25
TCMDC-125849	0,12	0,14	18
TCMDC-125521	0,12	0,77	23
TCMDC-137771	0,14	0,95	20
TCMDC-137907	0,16	0,30	17
TCMDC-125004	0,19	0,80	10
TCMDC-142295	0,20	0,37	12
TCMDC-142246	0,21	0,79	13
TCMDC-124805	0,26	0,17	14
TCMDC-123865	0,26	0,15	>25
TCMDC-125487	0,27	0,60	>25
TCMDC-133920	0,29	0,14	13
TCMDC-124542	0,30	0,40	>25
TCMDC-131825	0,30	0,31	>25
TCMDC-137453	0,31	1,38	13
TCMDC-136642	0,33	0,75	>25
TCMDC-136678	0,33	0,91	17
TCMDC-125531	0,35	0,21	21
TCMDC-134315	0,38	0,59	12
TCMDC-125289	0,43	0,20	>25
TCMDC-124791	0,47	0,11	>25
TCMDC-136307	0,47	1,56	>25
TCMDC-123886	0,50	0,75	>25
TCMDC-125539	0,50	0,73	>25
TCMDC-132869	0,53	0,78	>25
TCMDC-125133	0,54	0,27	>25

Compound TCAMS ID	IC ₅₀ (μM)		
	Pf Gametocytes	Pf Asexual stages	Cytotoxicity HepG2
TCMDC-139286	0,56	1,28	14
TCMDC-134446	0,61	1,16	11
TCMDC-123885	0,67	0,77	21
TCMDC-125114	0,67	0,03	>25
TCMDC-132859	0,71	0,96	19
TCMDC-132860	0,74	0,84	20
TCMDC-137442	0,75	0,91	19
TCMDC-133872	0,83	0,18	7
TCMDC-125200	0,84	0,15	>25
TCMDC-132867	0,84	1,23	13
TCMDC-132872	0,86	0,86	13
TCMDC-124478	0,91	0,16	>25
TCMDC-124790	0,92	0,19	>25
TCMDC-139222	1,00	0,03	>25
TCMDC-132864	1,08	1,03	18
TCMDC-123475	1,17	0,27	>25
TCMDC-133351	1,18	0,19	>25
TCMDC-137569	1,19	0,17	13
TCMDC-133343	1,24	0,10	>25
TCMDC-135184	1,43	0,19	>25
TCMDC-132863	1,45	0,90	24
TCMDC-137895	1,50	0,32	>25
TCMDC-136560	1,64	0,53	>25
TCMDC-123792	1,79	0,16	>25
TCMDC-137476	1,88	0,12	19
TCMDC-124917	1,90	0,20	>25
TCMDC-124918	1,94	0,65	>25
TCMDC-132071	1,95	0,44	>25

Figura 4. Perfil biológico de los 56 compuestos priorizados. Las barras y la intensidad de color representan la potencia del compuesto frente a los gametocitos de *P. falciparum*, estadios asexuales y citotoxicidad.

Se eligieron 5 métodos de viabilidad (contenido de ATP, expresión de actividad luciferasa, contenido de lactato deshidrogenasa de *Plasmodium*, reducción del Presto Blue y análisis de imagen de gametocitos que expresan proteína verde fluorescente o GFP). Además se investigó el efecto de la cepa empleada (3D7A, NF54 o NF54HT GFP-luc), tiempo de exposición a los compuestos (48 o 72 h), medio de cultivo basal (RPMI_L o RPMI_H), suplemento del medio (AlbuMax II o suero humano) y punto de corte (1, 5 o 10 μ M) para identificar compuestos activos (Figura 5).

En este estudio se ensayaron 23 compuestos procedentes de la lista de 56 compuestos priorizados del TCAMS y varios compuestos control.

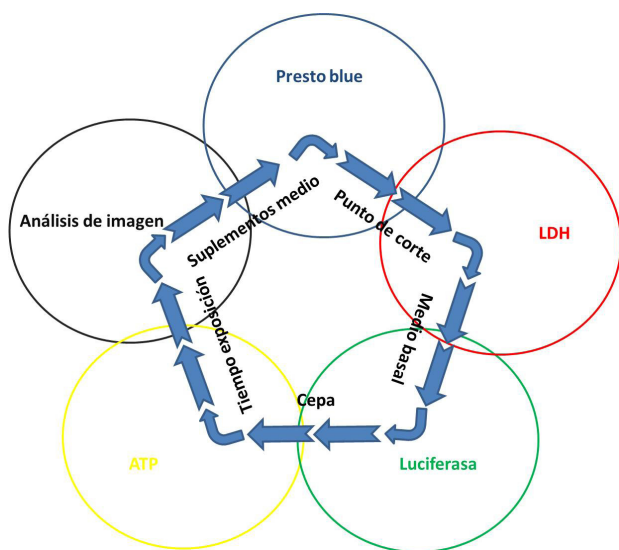


Figura 5. Representación de las interacciones entre métodos de viabilidad y condiciones experimentales.

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando un método estadístico llamado "Razón de Momios" basado en una distribución χ^2 que permite estimar la asociación entre una condición y su resultado.

Las conclusiones de este trabajo fueron las siguientes:

- El método no afectó significativamente la selección de compuestos.
- A las concentraciones 10 y 5 μ M los compuestos que se seleccionarían serían los mismos, mientras que a 1 μ M la selección se vio afectada como cabría esperar.
- El número de compuestos identificados en ensayos con tiempos de incubación de 48 o 72 horas fue similar.
- En el medio RPMI_L suero hubo un grupo de 6 compuestos y 1 control que no fueron identificados

como activos mientras que demostraron serlo en los otros 3 medios de ensayo empleados, cuyo medio basal era RPMI_H con diferentes suplementos. La diferencia entre el medio basal RPMI_L y RPMI_H, consiste en que este último tiene un mayor contenido de bicarbonato sódico y menor cantidad de glucosa.

Diversos experimentos llevados a cabo con compuestos de ese grupo, no identificados como activos en medio RPMI_L suero, arrojaron la conclusión de que entre las diferencias de formulación de RPMI_L y RPMI_H, la concentración del ión bicarbonato fue la responsable de las disparidades observadas en los resultados, mientras que los suplementos (suero humano o AlbuMax II) no desempeñaron ningún papel. Dos de los 6 productos y un compuesto control (NITB609) estaban descritos en la literatura como inhibidores del transportador de sodio PfATP4.

La observación por microscopía confocal reveló que los gametocitos incubados en medios con alto contenido de bicarbonato (medio basal RPMI_H) sufrían mayores alteraciones morfológicas con el paso del tiempo, perdiendo su tradicional forma alargada convirtiéndose en células redondeadas, con protuberancias en la membrana, manifestando una posible hinchazón del parásito.

También se dedujo que la presencia de suero como suplemento y de eritrocitos en la muestra favorecían la preservación de la morfología y funcionalidad de los gametocitos.

Se elaboró una hipótesis que pretende explicar las observaciones experimentales realizadas (Figura 6).

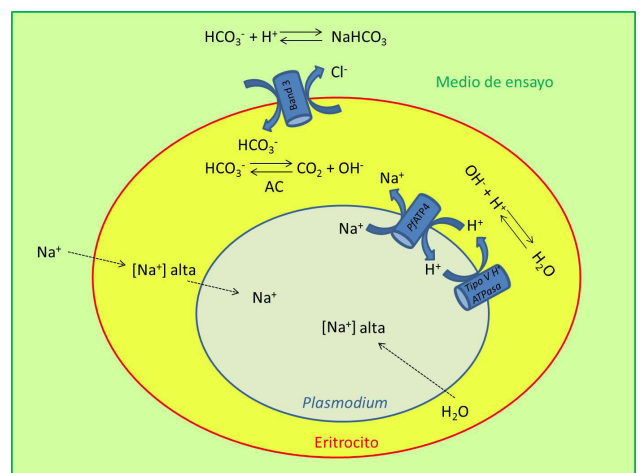


Figura 6. Esquema del posible efecto de una alta concentración del ión bicarbonato en el medio de cultivo sobre la concentración de Na^+ en el citoplasma del parásito.

En los eritrocitos parasitados, se establecen nuevas rutas de permeabilidad (PSAC) en la membrana del eritrocito, dirigidas por y para el parásito. Estas rutas aumentan la permeabilidad de cierto número de moléculas, como por ejemplo el Na^+ cuya concentración se ve muy incrementada en el interior del eritrocito, estableciéndose un gradiente a través de la membrana plasmática del parásito.

Para mantener la concentración de Na^+ baja en el interior de *Plasmodium*, a pesar de la continua entrada del ión por el gradiente establecido entre el citosol del eritrocito y el del parásito, debe existir un mecanismo que bombee el sodio al exterior, en contra de gradiente, con consumo de energía, este es proporcionado por el transportador ATPasa4 de *Plasmodium*.

Este transportador no sólo extrude el ión sodio del citoplasma del parásito, sino que lleva acoplada la importación de protones. Por este motivo, su inhibición provoca una alcalinización del citoplasma. Pero la concentración de protones en el parásito se ve regulada por otro transportador: H^+ -ATPasa de tipo V.

Si la concentración del ión bicarbonato en el medio de ensayo es alta, también aumentará su concentración en el citoplasma del eritrocito ya que el bicarbonato es transportado mediante un intercambiador aniónico reversible, Band 3, con el antiporte de Cl^- . Este ión bicarbonato en el interior del eritrocito, en una reacción catalizada por la anhidrasa carbónica, va a originar CO_2 y OH^- , aumentando el pH.

Para compensar esta alcalinización, el grupo hidroxilo reaccionará con protones para neutralizarse y si disminuye la cantidad de protones en el citoplasma del eritrocito, se puede ralentizar la extrusión de sodio (que va acoplada a la entrada de protones).

Puesto que el gradiente de Na^+ es muy alto, seguirán entrando cationes sodio y se acumularán progresivamente en el citoplasma del parásito. Este aumento de la concentración de sodio puede provocar la entrada de agua por ósmosis, hinchándose y cambiando la forma originalmente alargada de los gametocitos.

Esta hipótesis daría razón del fenómeno observado en este trabajo por el que algunos inhibidores de PfATP4 presentan un mayor efecto cuando los ensayos *in vitro* de viabilidad se desarrollan en medios con alta concentración de bicarbonato, siendo prácticamente indetectables en medios con menos bicarbonato. Se trataría de dos efectos aditivos sobre la homeostasis del sodio (inhibidor + bicarbonato). También explicaría el cambio morfológico que experimentan los gametocitos cuando se incuban en medios con elevada concentración de bicarbonato.

Queda así patente la importancia de algunas condiciones experimentales en los ensayos de cribado para la identificación de nuevos compuestos activos.

Parte de este trabajo de investigación está publicado en los siguientes artículos:

- Lelièvre, Joël, *et al.* "Activity of clinically relevant antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* mature gametocytes in an ATP bioluminescence "transmission blocking" assay." PloS one 7.4 (2012): e35019.
- Almela, Maria Jesus, *et al.* "A new set of chemical starting points with *Plasmodium falciparum* transmission-blocking potential for antimalarial drug discovery." PloS one 10.8 (2015): e0135139.

María Jesús Almela Armendáriz
Dpto. de Química Inorgánica y Química Técnica
GlaxoSmithKline Investigación y Desarrollo