

COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA ENTRE DERIVADOS QUIRALES Y RACÉMICOS DEL 1,8-CINEOL SOBRE LEISHMANIA INFANTUM Y LEISHMANIA DONOVANI. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD.

María del Huerto Loandos¹, Ana Carolina Muro¹, José María Alunda², María Jesús Corral Caridad², Margarita Beatriz Villecco¹

¹Instituto de Química Orgánica. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Ayacucho 471, S. M. de Tucumán. T4000INI, Argentina. ²Laboratorio ICPVet, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

E-mail: mhloandos@hotmail.com, tuly@fbqf.unt.edu.ar

Introducción:

Se denomina leishmaniasis al conjunto de manifestaciones clínicas, cutáneas, viscerales o mucocutáneas producidas por parásitos del género *Leishmania*. Esta enfermedad es transmitida a los humanos por los dípteros flebotómicos hembra *Phlebotomus* y *Lutzomyia* [1]. Es una zoonosis re-emergente de alto impacto en salud pública. Se estiman que en el mundo pueden existir 12 millones de infectados. En Argentina desde la década del 80 se registró un aumento en la frecuencia, intensidad y distribución de los brotes epidémicos de esta enfermedad. En el período 1995-2004 se notificaron 426 casos/año [2].

La leishmaniasis es una enfermedad crónica, de tratamiento complejo y de alto costo. Los compuestos antimoniales pentavalentes y pentamidina han provocado resistencia y poca efectividad en el tratamiento y, además, significativos efectos colaterales. Un elevado número de plantas de utilización ancestral, como diferentes especies de *Eucalyptus*, han conducido a la obtención de medicamentos modernos [3]. Se ha investigado la actividad insecticida de aceites esenciales de especies de *Eucalyptus* sobre varios estadios de *Lutzomyia longipalpis*, uno de los vectores responsables de la transmisión de leishmaniasis visceral [4].

En trabajos previos hemos descrito la preparación de derivados polioxigenados racémicos y quirales del cineol por síntesis quimioenzimática [5, 6]. En los mismos se investigó la actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, resultando los derivados polioxigenados más activos que el cineol [7]. Cabe mencionar que, *P. aeruginosa* se presenta como microorganismo oportunista en lesiones cutáneas producidas por *Leishmania*.

En base a estos antecedentes, decidimos investigar los efectos antiparasitarios y citotóxicos de siete derivados polioxigenados racémicos y quirales del 1,8-cineol obtenidos por síntesis, evaluando su actividad leishmanicida *in vitro* sobre *Leishmania infantum* y *L. donovani*.

Metodología:

Compuestos testados: se ensayaron los compuestos aquirales: 1,8-cineol (**1**), (\pm)-3-oxo- (**2**) y (\pm)-3-hidroxi-1,8-cineol (**3**) y los compuestos ópticamente activos: (-)-3-oxo (**9**), (+)-3-oxo (**7**) y los alcoholes (-)-3-hidroxi (**5**) y (+)-3-hidroxi-1,8-cineol (**8**) (**Esquemas 1 y 2**).

Parásitos: se utilizaron las cepas UCM 9 de *L. infantum* y Khartoum 1246 de *L. donovani* autóctonas de Madrid, España. Fueron mantenidas como promastigotes en medio RPMI 1640 (Lonza®) a 26°C, suplementado con suero bovino fetal inactivado (56°C, 30 min) y 100 U ml⁻¹ de penicilina con 100 µg ml⁻¹ de estreptomycin.

Macrófagos: se utilizó la línea celular macrofágica murina J774 cultivada en medio RPMI 1640 suplementado como se describió anteriormente, en atmósfera humidificada con 5% CO₂/aire a 37°C.

Ensayo sobre promastigotes, amastigotes y citotoxicidad: se llevaron a cabo utilizando las técnicas previamente descritas por Alunda y col. [8].

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado incluyendo controles positivos y negativos.

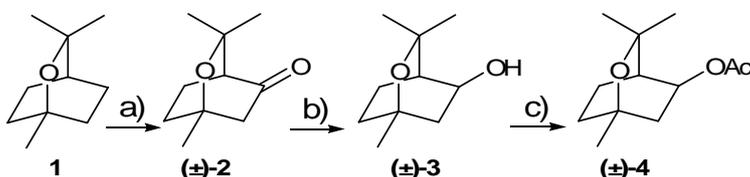
Resultados:

- En todos los compuestos estudiados no se observaron diferencias significativas de actividad leishmanicida frente a *L. donovani* y *L. infantum*.
- Todos los derivados fueron capaces de reducir la multiplicación de los promastigotes, a excepción de la mezcla racémica del alcohol **3**, la cual no mostró actividad.
- El 1,8-cineol presentó el mayor poder inhibitorio (70%, 500 µM) frente a promastigotes de ambas especies.
- Los compuestos quirales **5**, **7** y **9** causaron una inhibición del crecimiento de los promastigotes en un 40% (500 µM), mientras que los compuestos racémicos **2** y **3** presentaron menor actividad (10%). El (-)-alcohol **5** tuvo un 20% más de actividad que su antípoda (+)-alcohol, en las mismas condiciones. En cambio, las cetonas quirales (**7** y **9**) no mostraron diferencias significativas en sus actividades.
- Los resultados de citotoxicidad a las 48 h frente a células J774 mostraron que solamente la (-)-cetona **9** fue capaz de reducir en un 20% el crecimiento celular, presentando una citotoxicidad ligera. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por observación en microscopio de las células macrofágicas.
- Frente a amastigotes intracelulares los compuestos ensayados mostraron diferencias de actividad en la carga parasitaria y en la tasa de infección. En general los niveles de infección fueron bajos, siendo más sensible *L. donovani*. Sin embargo, la mayoría de los compuestos produjeron una disminución superior al 50% de la carga parasitaria.

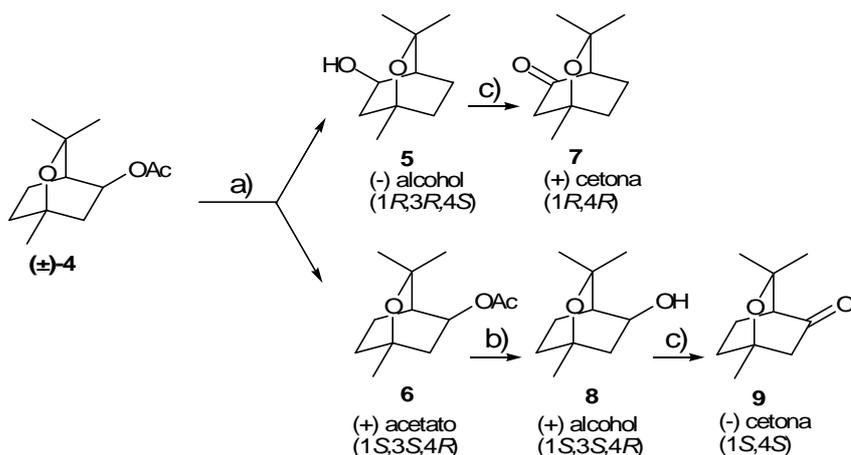
Conclusiones:

Se observó una marcada influencia de la quiralidad de los compuestos ensayados en la actividad biológica.

La obtención de derivados del 1,8-cineol funcionalizados en C-5 promete ser una alternativa válida para la producción de leishmanicidas.



Esquema 1: (a) CrO₂(AcO)₂; (b) NaBH₄/MeOH; (c) Ac₂O/Py.



Esquema 2: (a) PLE, pH 7, 37°C; (b) KOH, EtOH; (c) PCC, CH₂Cl₂

Referencias

- [1] Scott P, Artis D, Uzonna J, Zaph C. Immunol Rev 201: 318-38 (2004).
- [2] Salomón OD, Orellano PW, Quintana MG, Pérez S, Sosa Estani S, Acardi S, Lamfri M. Medicina 66: 211-219 (2006).
- [3] Mahboubi y Kazempour. Indian J Pharm Sci 71 (3): 343-347 (2009).
- [4] Maciel MV, Morais SM, Bevilaqua CM, Silva RA, Barros RS, Sousa RN, Sousa LC, Brito ES, Souza-Neto MA. Vet Parasitol 167: 1-7 (2010).
- [5] Loandos MH, Villecco MB, Burgueño-Tapia E, Joseph-Nathan P, Catalán CAN. NPC 4 (11): 1537-1545 (2009).
- [6] Loandos MH. Tesis Doctoral: "Síntesis de derivados polioxigenados del 1,8-cineol. Utilización de sistemas enzimáticos para la resolución de los racematos obtenidos". UNT. Argentina (2012).
- [7] Villecco MB, Catalán JV, Vega MI, Garibotto FM, Enriz RD, Catalán CAN. NPC 3: 303-468 (2008).
- [8] Wert L, Alakurtti S, Corral MJ, Sanchez-Fortún S, Yli-Kauhaluoma J, Alunda JM. J Antibiot 64: 475-481 (2011).