

Seguridad y Eficacia del Diclazurilo y del Decoquinato frente a *Besnoitia besnoiti in vitro*

Safety and Efficacy of Diclazuril and Decoquinatate against *Besnoitia besnoiti in vitro*

Laura Rico-San Román

Tutores:

Alejandro Jiménez-Meléndez y Gema Álvarez-García

Universidad Complutense de Madrid

Resumen

La besnoitiosis bovina es una enfermedad parasitaria de curso crónico y debilitante, re-emergente en Europa, y causada por el protozoo apicomplejo *Besnoitia besnoiti*. Actualmente no existen fármacos ni vacunas disponibles para su control. Por ello, en el presente trabajo se evaluó la seguridad y eficacia del diclazurilo y el decoquinato como posibles candidatos terapéuticos en un modelo *in vitro*, ya que están comercializados en el ganado bovino frente a otras infecciones protozoarias. El ensayo de citotoxicidad confirmó que ambos fármacos son seguros en el modelo *in vitro* utilizado. Además, ambos fármacos fueron eficaces inhibiendo tanto la invasión como la proliferación del parásito *in vitro*, mostrando el diclazuril y el decoquinato porcentajes de inhibición de la invasión del 90% y el 83% y una concentración inhibitoria 50 (CI50) de 20 nM y 135 nM, respectivamente. El presente estudio constituye una prueba de concepto de eficacia de estos fármacos *in vitro* frente a *B. besnoiti* y, por tanto, serían necesarios ensayos *in vivo* de eficacia y seguridad de ambos fármacos en la especie de destino.

Palabras clave: *Besnoitia besnoiti*, diclazurilo, decoquinato, *in vitro*, tratamiento.

Abstract

Bovine besnoitiosis, caused by the apicomplexan protozoa *Besnoitia besnoiti*, is a chronic, debilitating and a re-emergent disease of cattle in Europe. Currently, there are no drugs or vaccines available. Thus, in the present work, safety and efficacy of two therapeutical candidates, diclazuril and decoquinatate, have been evaluated using an *in vitro* model, since both compounds are commercially available for the treatment of other protozoan diseases in cattle. Cytotoxicity assay confirmed that both compounds are safe in the *in vitro* model employed. Besides, diclazuril and decoquinatate showed efficacy by inhibiting parasite invasion and proliferation *in vitro*, with a percentage of inhibition of invasion of 90% and 83% and an inhibitory concentration 50 (IC50) of 20 nM and 135 nM, respectively. The present study demonstrates proof of concept for the efficacy of these drugs against *B. besnoiti in vitro*. Thus, further *in vivo* assays to test safety and efficacy of both drugs should be performed in the target species.

Keywords: *Besnoitia besnoiti*, diclazuril, decoquinatate, *in vitro*, treatment.

Trabajo presentado en las XII Jornadas Complutenses, XI Congreso Nacional de Investigación en Ciencias de la Salud para Alumnos Pregraduados y XVI Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas.

Este trabajo ha sido financiado gracias a un proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad (Ref. AGL2013-04462). Alejandro Jiménez-Meléndez es beneficiario de un contrato predoctoral del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Ref. FPU13/05481).

Introducción y objetivo

La besnoitiosis bovina es una enfermedad parasitaria de curso crónico y debilitante ocasionada por el protozoo apicomplejo *Besnoitia besnoiti*. En 2010 fue declarada por la EFSA como enfermedad re-emergente en Europa y, actualmente, continúa expandiéndose ocasionando considerables pérdidas económicas (Álvarez-García, García-Lunar, Gutiérrez-Expósito, Shkap y Ortega-Mora, 2014). Durante la fase aguda de la enfermedad el estadio de taquizoíto es el responsable de los signos clínicos inespecíficos (hipertermia, pérdida de peso, edemas y orquitis). Posteriormente, el taquizoíto se transforma en bradizoíto y se multiplica lentamente en el interior de quistes tisulares con tropismo por el tejido conjuntivo de la piel y mucosas del tracto respiratorio superior y genital. Los quistes en la conjuntiva ocular son patognomónicos de la fase crónica de la enfermedad (Álvarez-García et al., 2014). Desafortunadamente, no existen fármacos disponibles, los cuales deberán combatir la fase aguda y así evitar el acantonamiento del parásito en tejidos. Dos posibles candidatos para tratar la besnoitiosis bovina podrían ser el diclazurilo y el decoquinato, ya que ambos compuestos han demostrado eficacia *in vitro* e *in vivo* frente a distintos parásitos apicomplejos y están comercializados frente a la coccidiosis ocasionada por especies del género *Eimeria* en el ganado bovino.

Por tanto, el objetivo del presente estudio fue estudiar la seguridad y la eficacia del diclazurilo y el decoquinato frente a la infección por *B. besnoiti* en un modelo *in vitro*.

Materiales y métodos

Cultivos celulares y mantenimiento del parásito

Los taquizoítos de *B. besnoiti* del aislado Bb-Spain1 se mantuvieron *in vitro* en la línea celular Marc-145 (Frey et al., 2016) y, una vez purificados, se emplearon para infectar placas de 24 pocillos a una dosis de infección parásito-célula hospedadora de 1:100.

Fármacos evaluados

Los fármacos empleados para el estudio fueron el diclazurilo (Vecoxan®, Elanco Lilly) y el decoquinato (Decox®, Zoetis), los cuales se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) y NaOH (0,1 N) / MetOH (90%), respectivamente.

Diseño experimental

Para evaluar la citotoxicidad de ambos fármacos, se empleó la prueba comercial XTT. La viabilidad de las células fue determinada en relación a los diluyentes empleados para cada fármaco (testigo negativo de tratamiento). Se realizó la prueba estadística t de Student (GraphPad prism 6.0.) para

determinar si existían diferencias significativas con los respectivos diluyentes.

Inicialmente, se evaluaron dos concentraciones distintas (10 μ M y 30 μ M) del diclazurilo y una única concentración del decoquinato (240nM) a las 0 horas postinfección (hpi) (momento de la infección, para estudiar la inhibición de la invasión del parásito) y a las 6 hpi (cuando se ha completado el 50% de la invasión, para estudiar la inhibición de la proliferación). Transcurridas 72 h, se realizó una inmunofluorescencia directa (IFD) y se determinó la inhibición de la invasión y proliferación de los taquizoítos. Para ello, se realizó el recuento de placas de lisis y vacuolas parasitóforas en cada pocillo (Frey et al., 2016), relativizándolo frente al testigo negativo, para, a continuación, calcular la tasa de inhibición de los fármacos.

Las concentraciones inhibitorias (CI) 50 y 99 (concentraciones a las cuales se reduce un 50% y 99% el crecimiento del parásito, respectivamente) del diclazurilo y el decoquinato se evaluaron a las 0 hpi empleando las concentraciones mostradas en la Fig. 1. Transcurridas 72 hpi se determinó el número de taquizoítos /ng DNA mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR; Frey et al., 2016). Las CI50 y CI99 se calcularon mediante extrapolación en la curva obtenida con la plantilla para Microsoft Excel EC50vplus. Cada condición se analizó por triplicado y se realizaron 3 réplicas independientes. Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis (GraphPad prism 6.0.).

Resultados y discusión

Ninguno de los compuestos presentó citotoxicidad, al no encontrarse diferencias significativas entre los fármacos y sus respectivos testigos negativos (DMSO o NaOH/MetOH) ($p > 0.05$, t de student). Por tanto, ambos compuestos son seguros en el modelo *in vitro* utilizado. Tras realizar tratamientos a las 0 y 6 hpi, tanto el diclazurilo como el decoquinato mostraron una elevada eficacia frente a la infección por *B. besnoiti* *in vitro* (Tabla 1).

Tabla 1
Inhibición de la invasión (0 hpi) y la proliferación (6 hpi) del parásito.

Fármaco	0 hpi (%)	6 hpi (%)
Decoquinato 240 nM	91,2	72,1
Diclazurilo 30 μ M	83,2	72,9
Diclazurilo 10 μ M	61,1	48,6

El decoquinato administrado a las 0 hpi a una concentración de 240 nM mostró los mayores porcentajes de inhibición, seguido del diclazurilo administrado a una concentración de 30 μ M a las 0 hpi.

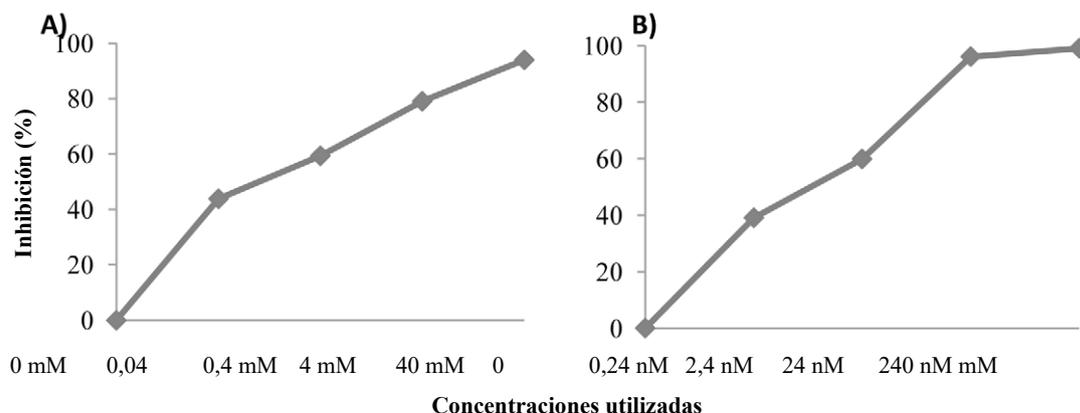


Figura 1. Inhibición de la proliferación determinados por qPCR cuando se administró el diclazurilo (A) y el decoquinato (B) a las 0 hpi.

Al disminuir la concentración de ambos fármacos se observó una disminución de los porcentajes de inhibición ($p < 0.01$, Kruskal-Wallis), lo que demuestra un efecto dosis dependiente. Las CI50 y CI99 del diclazurilo fueron de 135 nM y 29,5 μ M, respectivamente. En el caso del decoquinato, la CI50 fue de 20 nM y la CI99 de 120 nM. Estos resultados son similares a las CI estimadas con el decoquinato frente a *Sarcocystis neurona* (Lindsay, Nazir, Maqbool, Ellison y Strobl, 2013) o con el diclazurilo frente a *Neospora caninum* (Qian et al., 2015).

Los resultados obtenidos demuestran que ambos fármacos son más eficaces frente a la invasión que frente a la proliferación del parásito. Estos resultados junto con los datos conocidos de la farmacocinética de ambos compuestos aportan una información muy útil acerca del posible empleo de estos fármacos en un futuro en la especie de destino. El diclazurilo presenta bajos niveles de biodisponibilidad, con una concentración plasmática máxima (CPM) de 95,8 nM a las 12 h post-tratamiento tras administrar una única dosis de 5mg/kg por vía oral (según la Agencia Europea del Medicamento) en el tratamiento de la coccidiosis en el ganado bovino. La CPM es notablemente inferior a la CI99 estimada frente a *B. besnoiti*. Sin embargo, en el caso del decoquinato se ha observado una CPM en ganado lechero de 2,3 μ M (Quintero-deLeonardo, Rosiles, Bautista, González-Monsón y Sumano, 2009), notablemente superior a la CI99 obtenida *in vitro*.

Conclusiones

Se ha evaluado, por primera vez, la seguridad y eficacia del diclazurilo y el decoquinato frente a la infección por *B. besnoiti in vitro*. Los resultados obtenidos demuestran que ambos compuestos son seguros y eficaces, siendo el deco-

quinato el fármaco que presentó los resultados más prometedores. Al tratarse de fármacos ya comercializados en el ganado bovino, sería factible contar con fármacos eficaces frente a la besnoitiosis bovina a corto-medio plazo, si bien es necesario que las empresas farmacéuticas realicen ensayos de eficacia y seguridad de estos fármacos en la especie de destino.

Referencias

- Álvarez-García, G., García-Lunar, P., Gutiérrez-Expósito, D., Shkap, V., & Ortega-Mora, L. M. (2014). Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Parasitology*, 141(11), 1419-1435. <http://doi.org/10.1017/S0031182014000729>
- Frey, C. F., Regidor-Cerrillo, J., Marreros, N., García-Lunar, P., Gutiérrez-Expósito, D., Schares, G., ... Álvarez-García, G. (2016). *Besnoitia besnoiti* lytic cycle in vitro and differences in invasion and intracellular proliferation among isolates. *Parasites & Vectors*, 9(1), 115. <http://doi.org/10.1186/s13071-016-1405-9>
- Lindsay, D. S., Nazir, M. M., Maqbool, A., Ellison, S. P., & Strobl, J. S. (2013). Efficacy of decoquinate against *Sarcocystis neurona* in cell cultures. *Veterinary Parasitology*, 196(1), 21-23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.008>
- Qian, W., Wang, H., Shan, D., Li, B., Liu, J., & Liu, Q. (2015). Activity of several kinds of drugs against *Neospora caninum*. *Parasitology International*, 64(6), 597-602. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.08.002>
- Quintero-deLeonardo, J., Rosiles, R., Bautista, J., González-Monsón, N., & Sumano, H. (2009). Oral pharmacokinetics and milk residues of decoquinate in milking cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32(4), 403-406. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.01049.x>