

# QUIMIOTERAPIA DE LA MALARIA EN MONOS SUDAMERICANOS <sup>1</sup>

Dr. William E. Rothe <sup>2</sup>

*La producción de nuevos agentes para el tratamiento de la malaria por P. falciparum resistente se acelera cuando se utiliza el sistema modelo de asociación parásito/mono (P. falciparum/nictopiteco). En ese sentido se están ensayando medicamentos contra las especies de parásitos que se han observado en el hombre y en un organismo primate, cuyas reacciones son cualitativamente iguales a las observadas en ensayos similares efectuados en el hombre.*

Si bien se ha descubierto que solo dos especies de malaria ocurren en forma natural en monos sudamericanos por lo menos siete especies más de monos se han infectado en experimentos con una o más formas comunes de malaria humana (1). Desde el punto de vista de la quimioterapia, la más útil de estas asociaciones de parásito y mono ha sido el *Plasmodium falciparum* en el *Aotus trivirgatus* (mono nictopiteco). En el Programa del Ejército de E.U.A. de Producción de Medicamentos contra la Malaria, se ha podido emplear este método modelo en la búsqueda de nuevos agentes para la profilaxis supresiva y la terapia en casos de malaria por *P. falciparum* resistente a los medicamentos. Los detalles sobre la organización y la administración de este importante programa han sido descritos por otros expertos en la materia (2, 3).

Este programa constituye un esfuerzo multidisciplinario que comprende síntesis químicas, ensayos biológicos, evaluaciones toxicológicas y estudios clínicos sobre

posibles medicamentos antimaláricos. Hasta la fecha, se han sometido once medicamentos o combinaciones de estos a extensos ensayos clínicos, y muchos otros se encuentran en la lista de espera para la iniciación de estudios con voluntarios. La selección de las sustancias químicas que se han de elaborar para los ensayos clínicos depende en gran parte de la eficacia antimalárica observada en el sistema modelo nictopiteco/*falciparum*. Este se empezó a utilizar inmediatamente después de que Schmidt (4) determinó los métodos de cría y las técnicas necesarias para mantener grandes criaderos de nictopitecos y diversas cepas de parásitos maláricos humanos. Se adaptaron ocho cepas de *falciparum* al nictopiteco por medio de varias transferencias a animales esplenectomizados, seguidas de pases repetidos en sujetos no contaminados. La evaluación de los medicamentos antimaláricos corrientes contra infecciones en nictopitecos no contaminados ha indicado que la reacción a medicamentos preparados con estas cepas de *P. falciparum* difiere ampliamente, desde una sensibilidad total hasta una resistencia a medicamentos múltiples. Con objeto de asegurar el bienestar del animal y conservar el medicamento, por lo general se usan solo dos cepas para determinar la eficacia de posibles medicamentos antimaláricos, es decir, la infección Vietnam Oak Knoll, que se caracteriza por una fuerte resistencia a la cloroquina y a la

<sup>1</sup> Publicado en inglés en *First Inter-American Conference on Conservation and Utilization of American Nonhuman Primates in Biomedical Research*, Organización Panamericana de la Salud, Publicación Científica 317, Washington, D.C., 1976, págs. 164-168.

Este trabajo constituye la aportación No. 1349 al Programa de Investigaciones del Ejército sobre la Malaria. En la realización de este estudio, los investigadores se basaron en la Guía de instalaciones de laboratorio para animales y su mantenimiento ("Guide for Laboratory Animal Facilities and Care"), promulgada por el Instituto de Recursos Animales de Laboratorio, Consejo Nacional de Investigaciones (EUA).

<sup>2</sup> Director, División de Química Medicinal, Instituto Walter Reed de Investigaciones del Ejército, Washington, D.C., E.U.A.

quinina pero que es susceptible a la pirimetamina, y las infecciones Vietnam Smith, que son resistentes a estos tres medicamentos.

Se comprobaron las ventajas previstas de ensayar posibles sustancias antimaláricas en un sistema primate usando parásitos humanos de reacción conocida a los medicamentos. Mediante el empleo del modelo nictopiteco/*falciparum* fue posible: 1) reducir el número de voluntarios que se necesitan para el estudio clínico de posibles sustancias antimaláricas; 2) disminuir el costo y tiempo requerido para elaborar el medicamento, y 3) prever la eficacia del medicamento contra parásitos resistentes a medicamentos múltiples antes de exponer a seres humanos a fármacos nuevos. Estas ventajas justifican plenamente el apoyo recibido tanto de los encargados del suministro continuo de nictopitecos para investigaciones médicas como de los que se dedican a la ciencia de elaboración de medicamentos antimaláricos.

Las siguientes observaciones preclínicas sobre posibles sustancias antimaláricas derivadas de nuevas clases de arilaminoalcoholes corroborarán mejor la validez del sistema nictopiteco/*falciparum* en la elaboración de medicamentos antimaláricos.

## Materiales y métodos

### Sistemas de ensayo

Ya se ha descrito (4) el modelo nictopiteco/*falciparum* utilizado por Schmidt para evaluar la actividad de posibles agentes antimaláricos. La evaluación de la actividad de los nuevos compuestos comprende estudios de dos cepas de *P. falciparum* de diversa reacción a los medicamentos. Reiterando lo ya señalado, se emplean las cepas Vietnam Oak Knoll y Vietnam Smith. Se inyecta un parásito determinado por vía intravenosa a grupos de 26 a 32 animales completamente acondicionados, recibiendo cada animal  $5 \times 10^6$  de trofozoítos. Cuando las parasitemias alcanzan densidades de 20

a 100 parásitos por 10,000 eritrocitos, los animales son asignados a grupos testigo o de tratamiento. Se administran por vía oral compuestos de ensayo una vez al día durante siete días seguidos a los animales de los grupos de tratamiento y se verifica regularmente la parasitemia. Si esta desaparece y no vuelve a surgir durante un período de observación ulterior de 12 semanas, se consideran curadas las infecciones.

D. Davidson, del Laboratorio de Investigaciones Médicas de SEATO en Bangkok, Tailandia, utiliza el modelo *rhesus/P. cynomolgi*. Monos jóvenes adultos de uno u otro sexo reciben inyecciones por vía intravenosa de  $5 \times 10^8$  de eritrocitos contaminados con *P. cynomolgi* (cepa B). Cuatro días después de la inoculación, se administra por vía oral el compuesto de ensayo una vez al día durante siete días seguidos. Se verifican a diario las parasitemias y se esplenectomizan los animales que presenten muestras sanguíneas negativas en el trigésimo día después del tratamiento. La ausencia de parasitemia en el período de 30 días después de la esplenectomía indica cura. En otra oportunidad se ha descrito en detalle (5) el sistema de rata/*P. berghei* (cepa KGB 173) para detectar en un gran número de sustancias químicas la eficacia antimalárica. Se infectan ratas jóvenes suizas inyectándoles por vía intraperitoneal sangre heparinizada con un mínimo de  $10^6$  de eritrocitos contaminados. Por lo general, los animales no tratados contraen una misma enfermedad mortal unos seis u ocho días después. Todos los compuestos de prueba se suspenden en aceite de maní y se administran por vía subcutánea 72 horas después que las ratas han sido infectadas con *P. berghei*. Los animales tratados se mantienen en observación durante 60 días y los que sobreviven ese período se consideran curados.

### Medicamentos antimaláricos

El número de registro, la nomenclatura química y la fuente de referencia de los me-

dicamentos experimentales que se utilizaron en estos estudios figuran a continuación:

- WR-142,490.  $\alpha$ -(2-Piperidilo)-2,8-bis(trifluorometilo)-4-quinolina-metanol (6).
- WR-171,669. 1-(1,3-Dicloro-6-trifluorometilo-9-fenantrilo)3-di-(*n*-butilo)aminopropanol (7).
- WR-172,435. 3-(Dibutilamino)-1[2,6-bis(trifluorometilfenilo)-4-piridilo]propanol (7).
- WR-154,904.  $\alpha$ -(2-Piperidilo)-2,6-di-(p-trifluorometilfenilo)-4-piridinemetanol (8).
- WR-180,409.  $\alpha$ -(2-Piperidilo)-2-(4-trifluorometilfenilo)-6-trifluorometilo-4-piridinemetanol (8).

### Resultados y examen

A fin de asegurar una buena salud y mantener la calidad y eficacia de la medicina, es indispensable que se continúen las investigaciones innovadoras de medicamentos (9). Si bien la producción de medicamentos modernos depende principalmente de estudios amplios en animales con objeto de verificar su eficacia e inocuidad, la evaluación definitiva de nuevas sustancias antimicrobianas debe efectuarse en el hombre. De primordial importancia es la protección de los derechos y el bienestar de estos sujetos voluntarios. Todo hallazgo preclínico que disminuya el número de hombres-días necesarios para determinar la tolerancia y eficacia de un nuevo medicamento contribuye a

mantener a nuestro mejor aliado: el voluntario.

La producción de nuevos agentes para el tratamiento de la malaria por *P. falciparum* resistente a las drogas se acelera cuando se utiliza el sistema modelo de nictopiteco/*P. falciparum*. En este sentido, se están ensayando medicamentos contra las especies de parásitos que se han observado en el hombre y en un organismo primate cuyas reacciones son cualitativamente iguales a las observadas en ensayos similares efectuados en el hombre. Estas ventajas no nos permiten pasar por alto los estudios clínicos, pero, como se indica en el cuadro 1, los resultados en animales pueden sugerir cuál es la dosificación óptima que debe utilizarse en los protocolos clínicos. Una dosis única de WR-142,490 resultó más eficaz contra el *falciparum* Oak Knoll que una cantidad igual de medicamento administrado en dosis diarias separadas. Por el contrario, el WR-171,669 tuvo eficacia máxima cuando se administró a diario durante varios días. Posteriormente se demostró que estas dos sustancias antimaláricas curaban infecciones experimentales de *P. falciparum* humano resistente a medicamentos múltiples (2). Se administró WR-142,490 a sujetos humanos en una dosis oral única; WR-171,669 en tres dosis diarias. Con el mono modelo se pudo

CUADRO 1—Influencia de la dosificación en la eficacia del WR-142,490 y WR-171,669 contra infecciones establecidas de la cepa Vietnam Oak Knoll de *P. falciparum* en el nictopiteco.

Medicamento	Dosis diaria <sup>a</sup> (mg/kg x días)	Eliminación del parásito (días después Rx)	Animales curados (No./total)
WR-142,490	10.94 x 1	6	3/3
	3.65 x 3	8	3/6
	1.56 x 7	7.5	5/8
WR-171,669	35 x 1	6	0/3
	70 x 1	5	0/3
	5 x 7	5.6	2/5
	10 x 7	5.6	10/10

<sup>a</sup> Medicamento administrado por vía oral una vez al día.

prever preclínicamente el régimen de dosificación óptima de estos medicamentos y la ventaja de lograr una reducción sustancial en el número de voluntarios que se requieren para evaluar el medicamento.

También se economizó tiempo de investigación. La optimización de un régimen de tratamiento con medicamentos activos como el WR-142,490 pudo haber requerido de dos a tres años de estudios clínicos antes de someterlo a evaluación sobre el terreno. Puesto que la selección de la dosificación se basó en observaciones preclínicas bien fundamentadas, el tiempo se redujo de uno a dos años.

Antes de que hubiera sistemas para ensayar las drogas en los que se usaran parásitos maláricos humanos y monos sudamericanos, el químico dedicado a la elaboración de productos medicinales solo podía valerse de otros modelos mamíferos en la búsqueda de nuevas sustancias antimaláricas. En estos métodos más antiguos se provoca la infección por *P. berghei* en ratas de laboratorio y por *P. cynomolgi* en el rhesus. Ambos métodos son confiables y continúan siendo instrumentos valiosos, aunque limitados, en la producción moderna de medicamentos para la quimioterapia de la malaria. Las limitaciones del sistema de prueba se pusieron de manifiesto después que se reconoció que la malaria resistente a la cloroquina constituía un grave problema sobre el terreno y que representaría una dificultad importante para el terapeuta.

Las ventajas logradas con el nictopiteco

infectado con cepas de *P. falciparum* de distinta reacción a los medicamentos pueden ilustrarse mediante el análisis de la evaluación de la eficacia de una nueva clase de sustancias antimaláricas sintéticas: los piridinemetanoles. Se seleccionaron para el estudio tres compuestos activos entre una amplia serie de posibles compuestos. La variación de la estructura química de los tres no es muy marcada. El WR-172,435 tiene una cadena de alquilaminoalquil, mientras que el WR-154,904 y el WR-180,409 tienen dos cadenas laterales de piperidilo y difieren solo en cuanto a la sustitución del núcleo piridino en la posición seis. Los resultados que se presentan en el cuadro 2 indican que los tres agentes son eficaces en distintas dosis contra una infección fulminante y mortal de *P. berghei* en la rata. Los datos del ensayo no apoyan un orden de prioridad de los sujetos en este grupo de compuestos.

Los resultados del modelo de *P. cynomolgi*/rhesus en el cuadro 3 son datos que se obtuvieron de un sistema que emplea más bien una infección de aumento lento que una enfermedad aguda y mortal. A diferencia de los resultados poco concluyentes en la rata, en este caso el WR-172,435 es decididamente el análogo menos eficaz. La actividad del WR-154,904 y del WR-180,409 es similar en las dosis utilizadas. Los tres compuestos han suscitado interés como medicamentos antimaláricos en dosis orales, que al parecer el nictopiteco tolera bien.

En el cuadro 4 se describe la eficacia del

CUADRO 2—Eficacia del piridinemetanol contra infecciones inducidas por trofozoitos de *P. berghei* en la rata sulza.

Medicamento	Reacción a la dosis				
	(% curado por dosis de mg/kg) <sup>a</sup>				
	640 mg	160	80	40	20
WR-172,435	100	100	100	80	60
WR-154,904	Tox.	100	100	80	20
WR-180,409	100	100	100	60	80

<sup>a</sup> Agentes suspendidos en aceite e inoculados por vía subcutánea a grupos de cinco ratas.

CUADRO 3—Eficacia del piridinemetanol contra infecciones inducidas por trofozoítos de *P. cynomolgi* en el mono rhesus.

Medicamento	Reacción a la dosis		
	(No. curado/total por dosis de mg/kg) <sup>a</sup>		
	31.6 mg	10	3.16
WR-172,435	2/2	1/2	0/2
WR-154,904	2/2	2/2	2/2
WR-180,409	---	2/2	2/2

<sup>a</sup> Agentes administrados por vía oral diariamente durante siete días.

piridinemetanol contra la malaria por *P. falciparum* resistente a medicamentos en el nictopiteco. Los resultados indican una tendencia evidente. El WR-180,409 es el compuesto más activo contra la cepa Vietnam Oak Knoll. Sin embargo, no se había previsto la resistencia de la cepa Smith a la cura con WR-154,904 aunque es sensible a dosis bajas de WR-180,409. La actividad dispar del WR-154,904 y el WR-180,409 es difícil de explicar sobre la base de la estructura química, lo que no se hubiera podido determinar si se hubieran utilizado otros animales disponibles. La notable eficacia del WR-180,409 contra la malaria por *P. falciparum* resistente a medicamentos múltiples permitió la selección de este piridinemetanol para investigaciones preclínicas y clínicas detalladas y la proyección de ensayos en seres humanos.

Debido a las numerosas ventajas del modelo nictopiteco/*P. falciparum* este sistema seguirá ocupando un lugar principal en la producción de medicamentos antimaláricos. Se ha logrado conservar a los

animales gracias a una utilización eficiente de los mismos y a métodos de investigación bien fundamentados. Además, con el sistema modelo utilizado se ha podido reducir el tiempo y número de voluntarios que la investigación requiere. Esto solo parece justificar las actuales medidas tendientes a garantizar una continua disponibilidad de nictopitecos para las investigaciones médicas.

#### Resumen

Desde el punto de vista de la quimioterapia de la malaria se ha comprobado la validez del sistema de asociación de parásito y mono, o sea, *Plasmodium falciparum* en el *Aotus trivirgatus* (mono nictopiteco). Así, la selección de las sustancias químicas que se han de elaborar para los ensayos clínicos depende en gran parte de la eficacia antimalárica observada en el sistema modelo nictopiteco/*falciparum*. Antes de que hubiera sistemas para ensayar las drogas en los que se usaran parásitos maláricos humanos y monos sudamericanos, el químico dedicado a la elaboración de productos medicinales solo podía

CUADRO 4—Eficacia del peridinemetanol contra infecciones inducidas por trofozoítos de cepas Vietnam Oak Knoll y Vietnam Smith de *P. falciparum* en el nictopiteco.

Medicamento	Dosis curativa <sup>a</sup>	
	VN Oak Knoll	VN Smith
WR-172,435	5	5
WR-154,904	5	>40
WR-180,409	2.5	5

<sup>a</sup> Dosis de mg/kg administrada por vía oral diariamente durante siete días.

valerse de otros modelos de mamíferos en la búsqueda de nuevas sustancias antimaláricas.

Hoy día, mediante el empleo del sistema modelo nictopiteco/*P. falciparum* es posible: 1) reducir el número de voluntarios que se necesitan para el estudio clínico de posibles sustancias antimaláricas; 2) disminuir el costo y el tiempo requerido para elaborar el medicamento, y 3) prever la eficacia de este

contra parásitos resistentes a medicamentos múltiples antes de exponer a seres humanos a nuevos fármacos.

Estas ventajas parecerían justificar plenamente los esfuerzos continuos para asegurar el suministro adecuado de nictopitecos para realizar investigaciones en relación con la elaboración de medicamentos antimaláricos. □

#### REFERENCIAS

- (1) Young, M. D. Natural and induced malarías in Western Hemisphere monkeys. *Lab Anim Care* 20:361-367, 1970.
- (2) Canfield, C. J. y R. S. Rozman. Clinical testing of new antimalarial compounds. Simposio de la Organización Mundial de la Salud (Rabat, 1-5 de abril de 1974).
- (3) Kinnamon, K. E. y W. E. Rothe. Biological screening in the U.S. Army antimalarial drug-development program. *Am J Trop Med Hyg* 24:174-178, 1975.
- (4) Schmidt, L. H. Infections with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in the owl monkey. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 67:446-474, 1973.
- (5) Osdene, T. S., P. B. Russell y L. Ranc. 2,4,7-triamino-6-ortho-substituted arylpteridines. A new series of potent antimalarial agents. *J Med Chem* 10:431-434, 1967.
- (6) Ohnmacht, C. J., F. Davis, y R. E. Lutz. Antimalarials. 7. bis (trifluoromethyl)- $\alpha$ -(2-piperidyl)-4-quinolinemethanols. *J Med Chem* 14:926, 1971.
- (7) Colwell, W. T., V. Brown y P. Christie. Antimalarial arylaminopropanols. *J Med Chem* 15:771, 1972.
- (8) La Montagne, M. P., A. Markovac y P. Blumbergs. Antimalarials. 6 Synthesis, antimalarial activity, and configurations of racemic  $\alpha$ -(2-piperidyl)-4-pyridinemethanols. *J Med Chem* 17:519, 1974.
- (9) Summary Report of the Conference on Drug Research in Prisons. Davis, California, Research Center, National Council on Crime and Delinquency, 1973.

#### Chemotherapy of Malaria in South American monkeys (Summary)

The *Plasmodium falciparum*/owl monkey (*Aotus trivirgatus*) model has been shown to have important application for malaria chemotherapy. Chemical substances to be developed for clinical trials are selected largely on the basis of antimalarial efficacy observed in this parasite/primate system. Before drug testing systems were available using human malaria parasites and South American monkeys, the medicinal chemist had to rely on other mammalian models in his search for new antimalarial drugs.

Today, with the *P. falciparum*/owl monkey model, it is possible: (1) to reduce the number of volunteers needed for clinical study of candidate antimalarials; (2) to decrease the time and cost of drug development; and (3) to predict drug effectiveness against multi-drug-resistant parasites prior to human exposure to new drugs.

These advantages would seem to fully justify continued efforts to assure an adequate supply of owl monkeys for research on antimalarial drug development.

#### A quimioterapia da malária em símios da América do Sul (Resumo)

Do ponto de vista da quimioterapia da malária, comprovou-se a validade do sistema de associação do parasito com o símio, ou seja, do *Plasmodium falciparum* no *Aotus trivirgatus* (macaco nictopiteco). Assim, a seleção das substâncias químicas que deverão ser elaboradas para as provas clínicas depende em grande parte da eficácia antimalárica observada no

sistema modelo nictopiteco/*falciparum*. Antes da existência de sistemas para o teste de drogas com a utilização de parasitos maláricos humanos e símios sul-americanos, o químico empenhado na elaboração de produtos medicinais só podia empregar outras espécies de mamíferos na busca de novas substâncias antimaláricas.

Atualmente, mediante o emprego do sistema

modelo nictopiteco/*P. falciparum*, é possível: 1) reduzir o número de voluntários que se necessitam para o estudo clínico de possíveis substâncias antimaláricas; 2) diminuir o custo e o tempo requerido para elaborar o medicamento; e 3) prever a eficácia da droga no combate a parasitos resistentes a medicamentos

múltiplos, antes de expor seres humanos a novos produtos farmacológicos.

Essas vantagens pareceriam justificar plenamente os esforços contínuos para assegurar o fornecimento de nictopitecos para fazer investigações em relação com a elaboração de medicamentos antimaláricos.

#### Chimio-thérapie du paludisme sur des singes sud-américains (Résumé)

Sur le plan de chimio-thérapie du paludisme, il a été possible de vérifier la validité de la combinaison parasite-singe ou plus précisément, du *Plasmodium falciparum* et du *Aotus trivirgatus* (singe nictalope). La sélection des substances chimiques qui doivent être préparées pour les expériences cliniques, dépend en grande partie de l'efficacité qu'elles auront manifestée contre le paludisme dans la combinaison-type nictalope/*falciparum*. Avant de pouvoir disposer d'autres combinaisons de spécimens pour expérimenter les médicaments contenant des parasites du paludisme prélevés sur des humains et sur des singes sud-américains, le chimiste chargé de la préparation des produits pharmaceutiques peut seul évaluer l'utilité d'autres types de mammifères dans la

recherche de nouvelles substances contre le paludisme.

De nos jours, on peut, en utilisant la combinaison singe nictalope/*falciparum* il est possible: 1) de réduire le nombre de volontaires nécessaires pour les études cliniques de substances possibles contre le paludisme; 2) de réduire le coût et le temps qu'exige la préparation du médicament; et 3) de démontrer l'efficacité de celui-ci contre des parasites résistants à de nombreux médicaments avant d'exposer des êtres humains à de nouveaux produits pharmaceutiques.

Cela paraît justifier pleinement les efforts pour assurer la fourniture continue de singes nictalopes pour la recherche en relation avec de nouveaux médicaments contre le paludisme.