

Nuevos Métodos para la búsqueda de combinaciones sinérgicas

Manero, Marcos¹; Ramón-García, Santiago^{1,2,3,4}; Aínsa JA.^{1,2,3} y Gómara, Marta¹

¹ Grupo de Genética de Micobacterias, Dpto. Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain; ² CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ³ Institute for Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI), Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain; ⁴ Research & Development Agency of Aragon (ARAID) Foundation, Spain

Introducción

La aparición de bacterias multirresistentes a los tratamientos actuales es un problema de interés internacional. Su velocidad de aparición supera la capacidad de desarrollo de nuevos fármacos. Es necesario encontrar nuevas vías para aprovechar los fármacos aprobados actualmente.

Objetivos

Determinar sinergias antimicrobianas entre compuestos.
Establecer un método estandarizado y rápido que permita la comparación simultánea de múltiples compuestos.

Metodología

1.- Búsqueda de nuevas sinergias por cribado semimasivo con replicador en medio sólido.

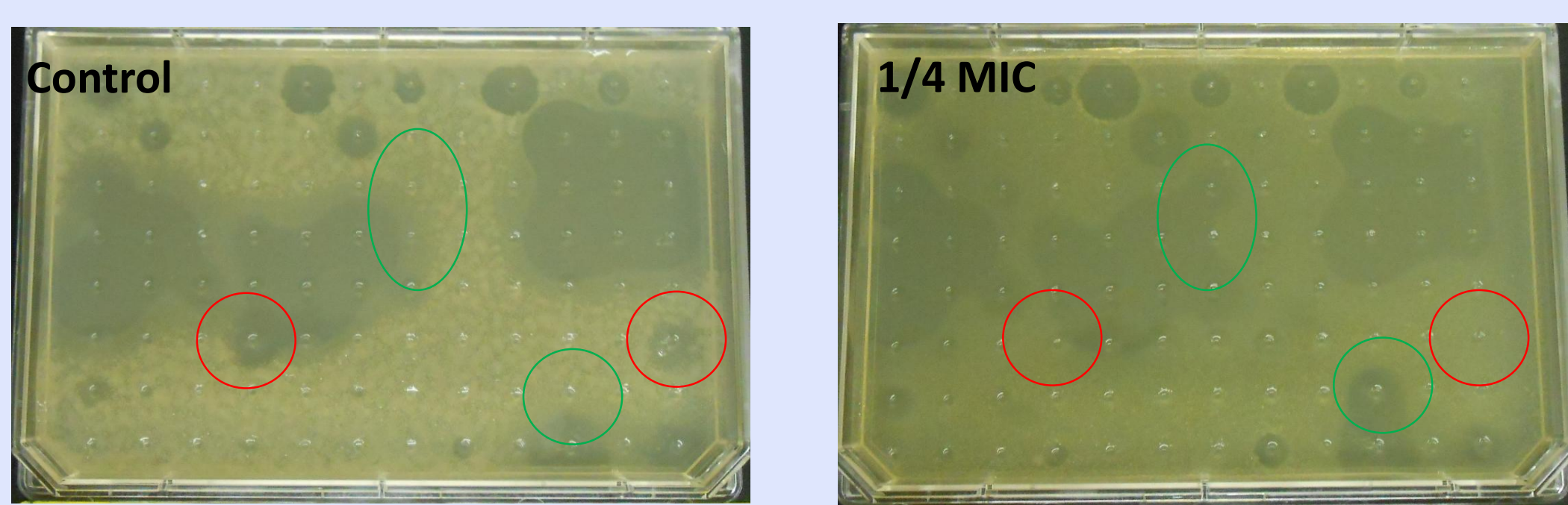


Fig 1. Crecimiento de halos de inhibición al colocar los compuestos secundarios desde una placa de 96 pocillos sobre una placa de agar MHII + Aztreonam (1/4 MIC) (compuesto primario). Indica posibles candidatos para sinergia entre control (sin antibiótico) y en presencia de antibiótico. Aparecen sinergias (verde) y antagonistas (rojo)

2.- Búsqueda de nuevas sinergias por Cribado por ensayos de viabilidad con MTT y Resazurina en medio líquido

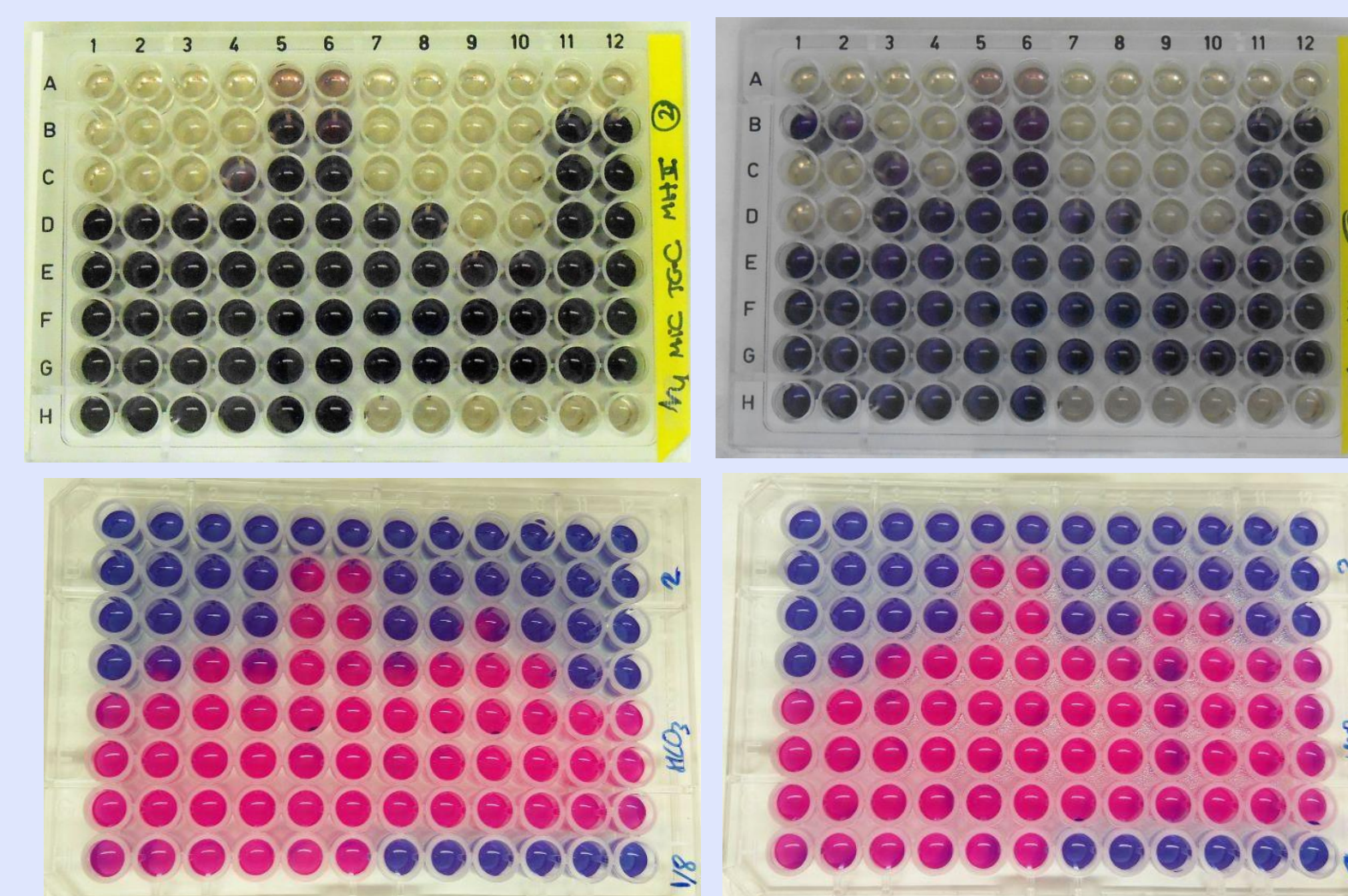


Fig 2. Ensayo de determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por MTT (arriba) y bactericida (CMB) por Resazurina (abajo) en presencia de Amikacina para medio MHII y MHII + HCO₃

Colocando en cada columna concentraciones decrecientes de compuestos secundarios bajo una misma concentración subinhibitoria de antibiótico (compuesto primario) en el medio, se observa si hay influencia de este antibiótico sobre la inhibición producida por el resto de sustancias. Comparando el ensayo con el control se puede determinar si existen sinergias cuando la CMI o CMB disminuyen ≥ 2 diluciones en presencia del antibiótico en el medio respecto a la placa control.

De esta manera, se pueden hallar las sustancias con sinergias con los diferentes antibióticos y las concentraciones efectivas para que esta ocurra.

3.- Ensayo secundario por Checkerboard

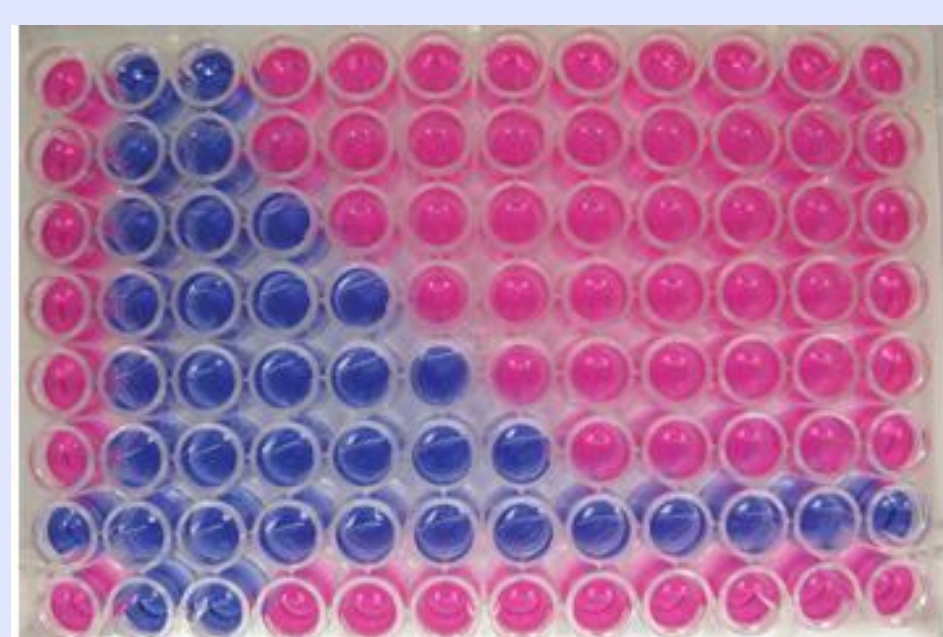


Fig 3. Ensayo Checkerboard, permite conocer fácilmente la interacción entre dos compuestos de manera visual y cuantitativa.

$$\frac{MIC A \text{ en presencia de } B}{MIC A} + \frac{MIC B \text{ en presencia de } A}{MIC B} = FICI$$

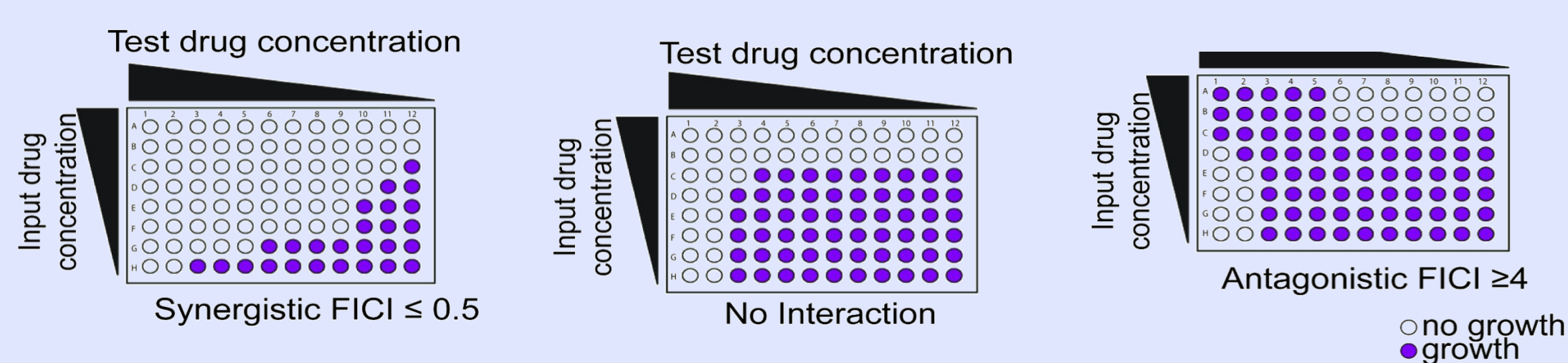


Fig 4. Ejemplo de interacciones en Checkerboard

Este método permite, no solo identificar o descartar sinergias entre distintos compuestos, sino cuantificar la efectividad de esa sinergia gracias al FICI. Para FICI > 0,5 se puede afirmar la existencia de sinergias.

4.- Ensayos de Farmacocinética y farmacodinámica por medio de Hollow Fiber

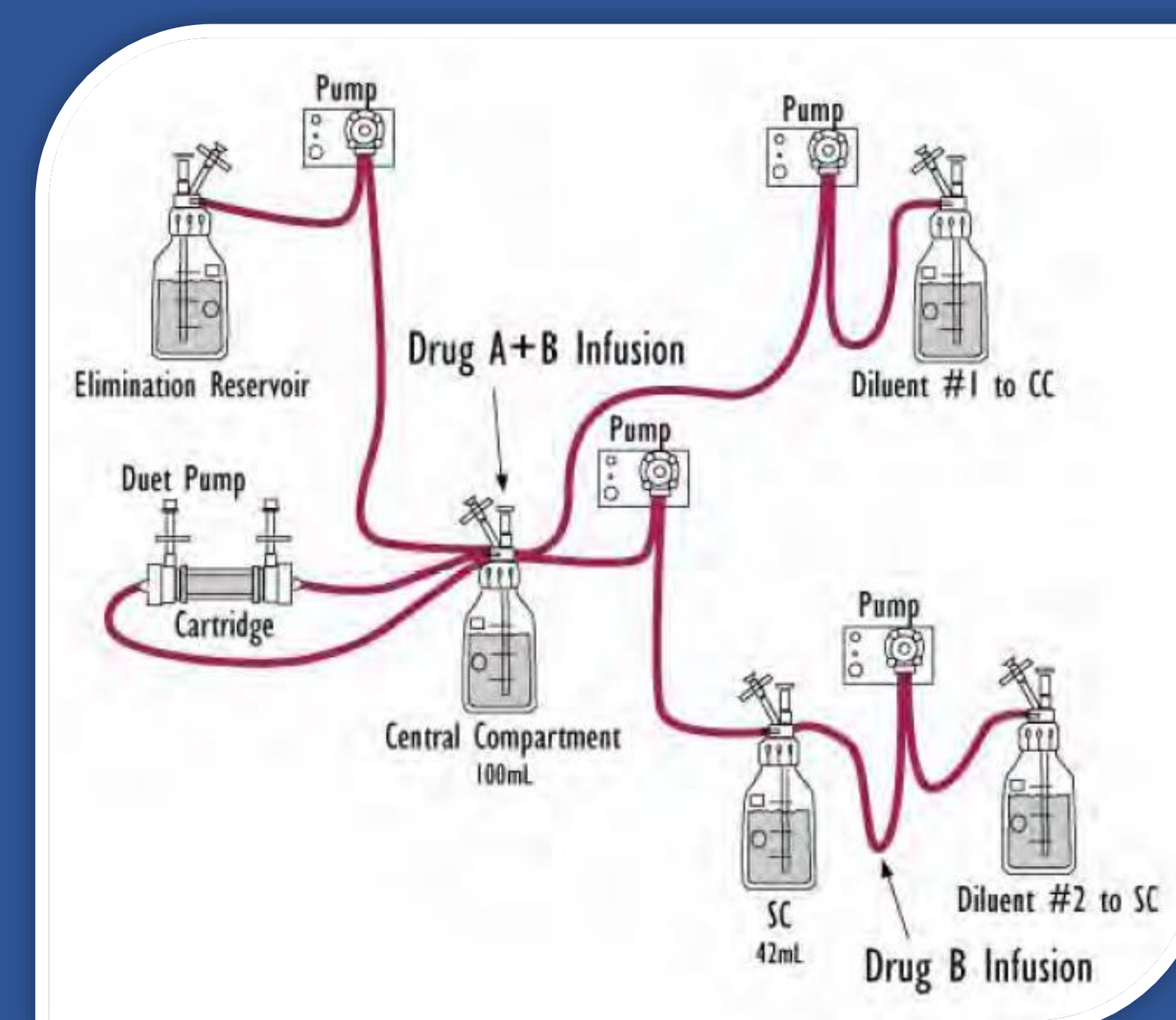


Fig 5. Ejemplo de Montaje por Hollow - Fiber

Este método permite recrear condiciones similares a las del cuerpo humano y controlar fácilmente las concentraciones de antibiótico que se suministra a la bacteria. Además permite suministrar dos antibióticos de manera simultánea para el estudio de sinergias.

Estado actual y proyección

Se han buscado sinergias por el método 1 para 20 antibióticos de uso clínico actualmente y 1430 compuestos aprobados por la FDA. Se ha realizado un cribado secundario por medio del método 2 para comprobar las sinergias. Próximamente se realizarán los estudios por checkerboard y hollow para comprender la eficacia de estas sinergias y la existencia de estas sinergias *in vivo*.

Referencias

- Odds, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *930000* (2018). doi:10.1093/jac/dkg301
- Ramón-García, S. *et al.* Synergistic Drug Combinations for Tuberculosis Therapy Identified by a Novel High-Throughput Screen. *55*, 3861–3869 (2011).
- Communication, S. & Cadwell, J. J. S. Advances in Antibiotics And Antibodies The Hollow Fiber Infection Model: Principles and Practice. **1**, 1–5 (2015).
- Ramón-García, S. *et al.* Repurposing clinically approved cephalosporins for tuberculosis therapy. *Nat. Publ. Gr.* 1–14 (2016). doi:10.1038/srep34293
- AU - Wambaugh, M. A. & AU - Brown, J. C. S. High-throughput Identification of Synergistic Drug Combinations by the Overlap2 Method. *JoVE* e57241 (2018). doi:doi:10.3791/57241