

# Reposicionamiento de fármacos conocidos para obtener nuevos tratamientos que bloqueen las respuestas inmunitarias innatas

Eloi Franco-Trepas<sup>1#</sup>, María Guillán-Fresco<sup>1#</sup>, Miriam López-Fagúndez<sup>1</sup>, Andrés Pazos-Pérez<sup>1</sup>, Ana Alonso-Pérez<sup>1</sup> and Rodolfo Gómez<sup>1\*</sup>



<sup>1</sup> Musculoskeletal Pathology Group Institute IDIS, Santiago University Clinical Hospital, Santiago de Compostela, 15706, Spain  
# Autores principales  
\*Corresponding author: Rodolfo.Gomez.Bahamonde@sergas.es



SERVIZO GALEGO de SAÚDE  
Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela  
Santiago de Compostela



## INTRODUCCIÓN

Patologías musculoesqueléticas como la artrosis y la sinovitis están disminuyendo constantemente la calidad de vida de la población. La artrosis se ha relacionado con el receptor de la inmunidad innata TLR4, el cual comparte cascada de señalización con el receptor IL1R. Aunque en el servicio de traumatología no existen fármacos inhibidores de TLR4, sí que se emplean en la práctica clínica de otras indicaciones. Tanto la naloxona, que revierte la sobredosis de opioides, como la talidomida, que actúa como antineoplásico, presentan actividad anti-TLR4.

## OBJETIVO

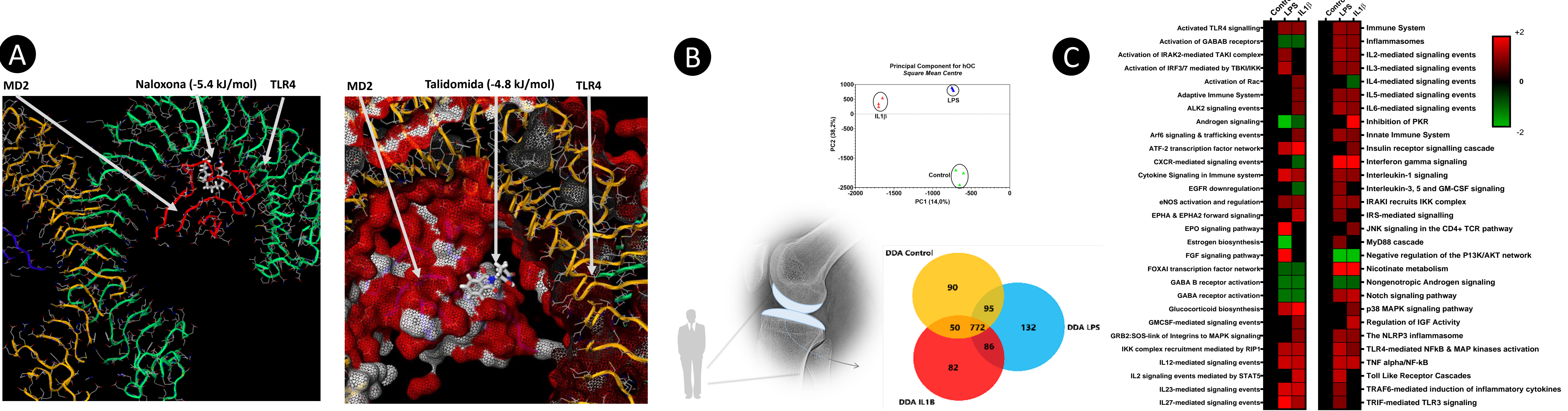
Determinar la actividad de naloxona (NLX) y talidomida (Th) para bloquear las respuestas inmunitarias innatas mediadas por TLR4 en condrocitos y sinoviocitos humanos primarios, y en condrocitos artrósicos para bloquear las respuestas inmunes innatas mediadas por TLR4.

## MÉTODOS

La afinidad de enlace entre fármacos y receptores fue determinada por el algoritmo optimizado Autodocks Inc.-Vina. El efecto de naloxona y talidomida en la respuesta inmune innata mediada por LPS [100ng/ml], agonista del TLR4, y por IL1B [0,1ng/ml], agonista del receptor IL1R, fue determinada en condrocitos humanos artrósicos aislados de cartílago de rodilla. El análisis proteómico masivo se realizó por MALDI/TOFF y se filtro por FDR 5% y p-valor <0,05. Los niveles de la citoquina interleuquina 6 (IL6) se determinaron por ELISA. El análisis de expresión génica (mRNA) se realizó por RT-PCR y la viabilidad se testó usando el ensayo MTT.

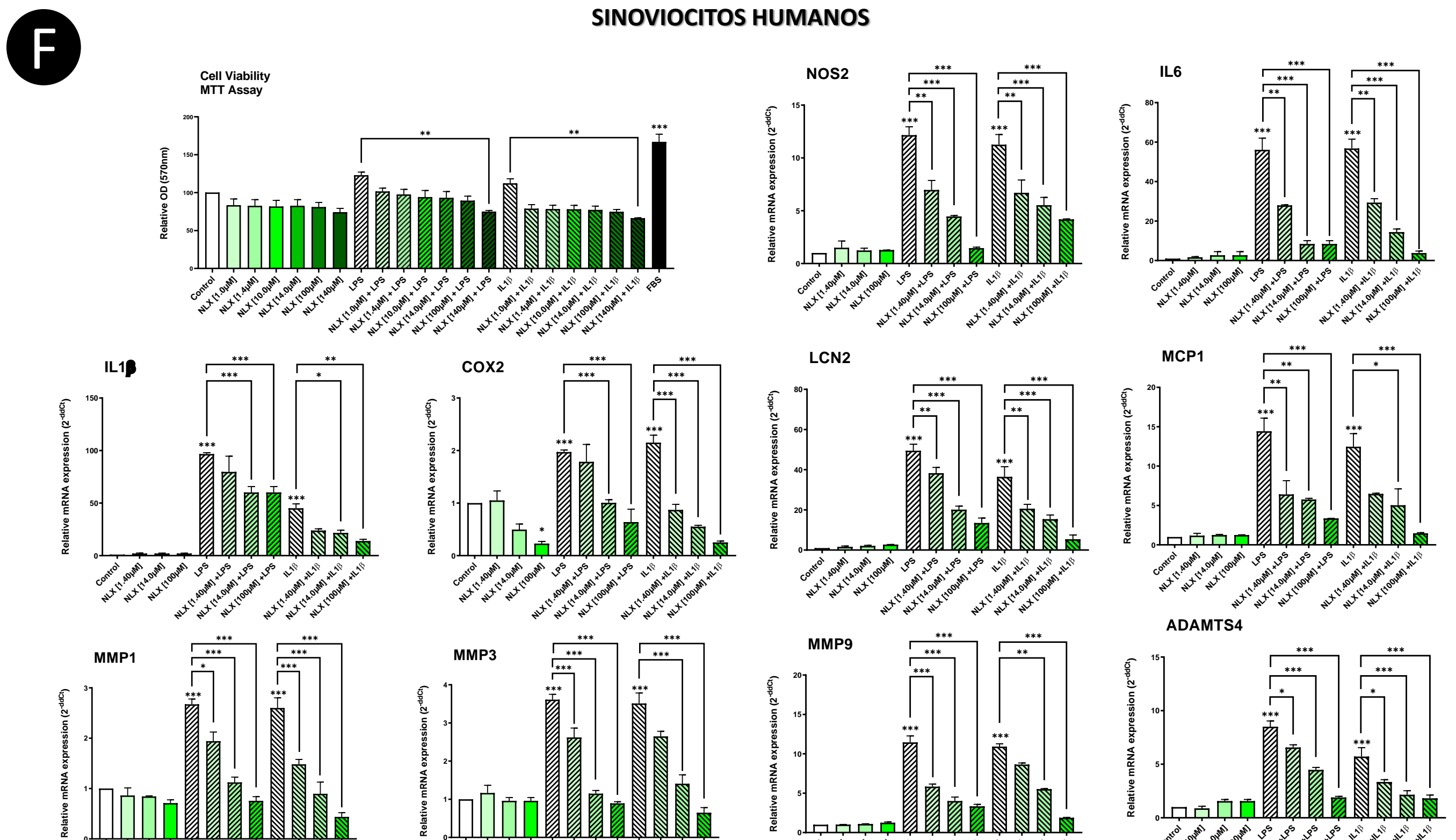
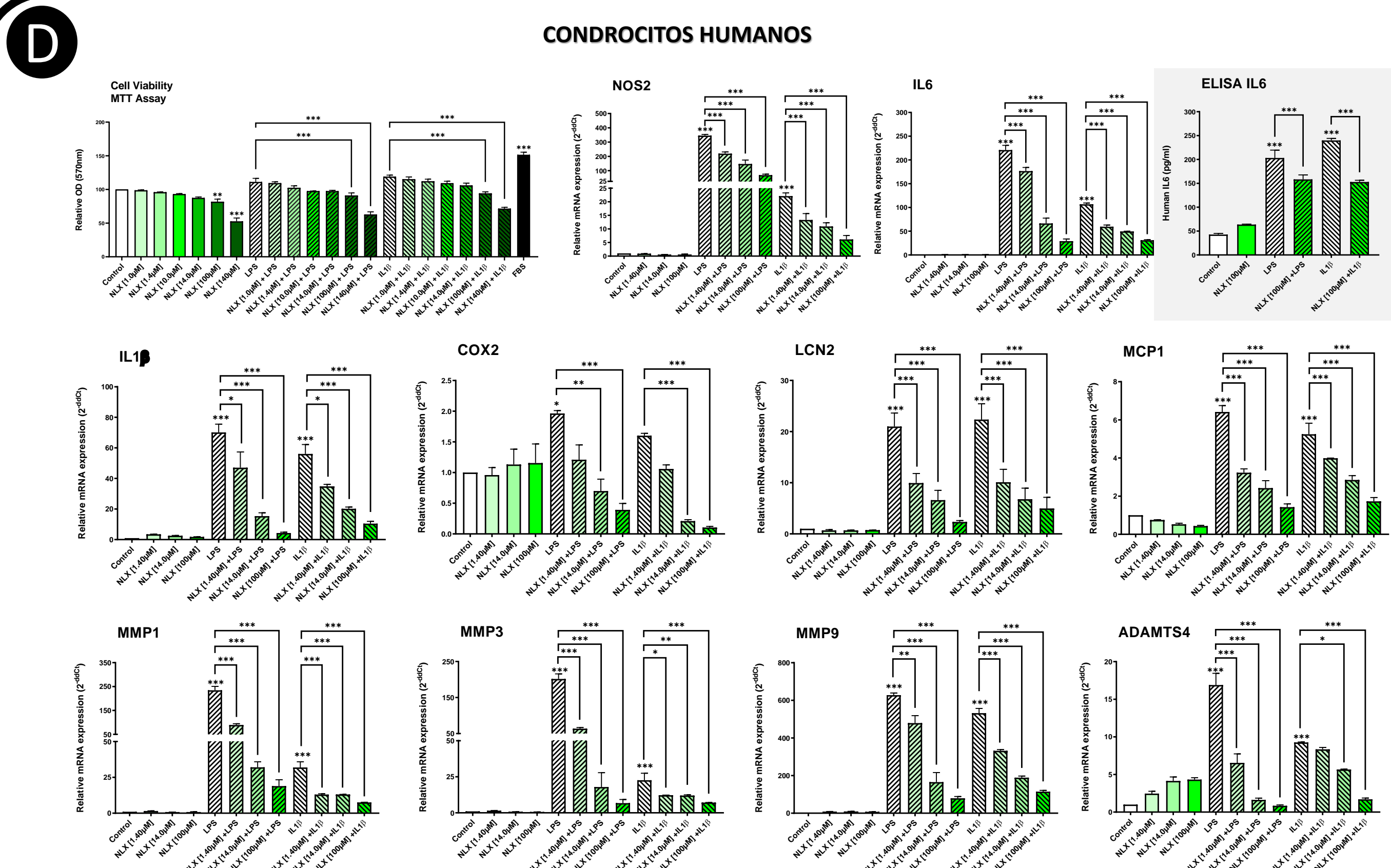
## RESULTADOS

La unión de naloxona (NLX) y talidomida (Th) al TLR4 fue validada por el análisis *in silico* de afinidad, sin embargo, la afinidad al IL1R se determinó energéticamente improbable. El análisis proteómico validó la activación de TLR4 y IL1R por los ligandos LPS y IL1B, revelando un enriquecimiento en las respuestas inmunitarias innatas. Dosis terapéuticas de naloxona y talidomida [1.4 – 100uM] previnieron, en condrocitos artrósicos humanos, la inducción de factores inflamatorios (IL6, IL1B, NOS2, COX2, LCN2 y MCP1) y catabólicos (MMP1, 3, 9 y ADAMTS4) por LPS [100ng/ml] y IL1B [0.1ng/ml] a nivel de ARNm (-90%) y proteínas. Resultados parecidos se obtuvieron para ambos fármacos en el modelo SW982de inflamación en sinoviocitos tanto a nivel de RT-PCR (-88%) como Western Blot (-50%) y ELISA (-35%).

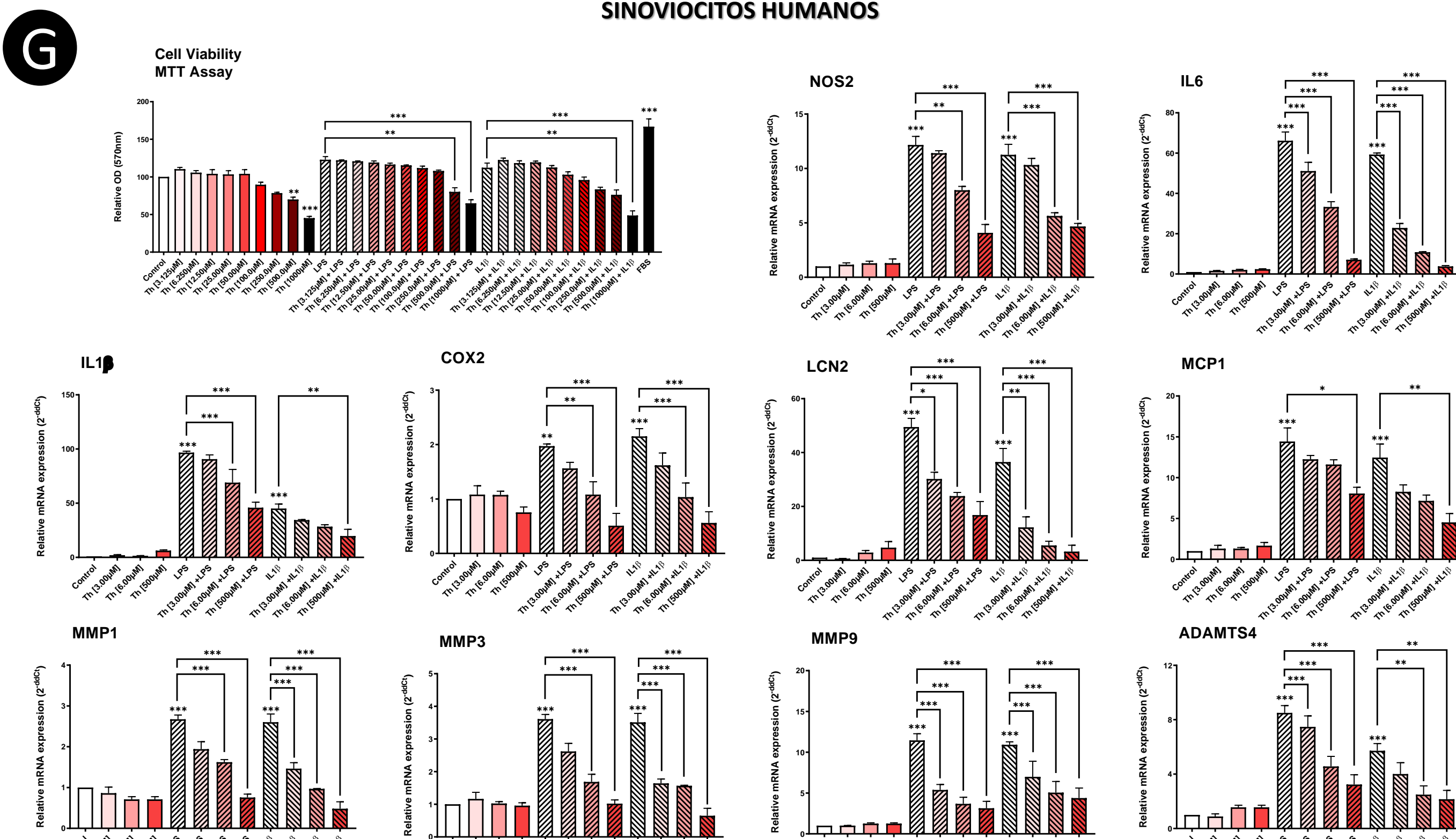
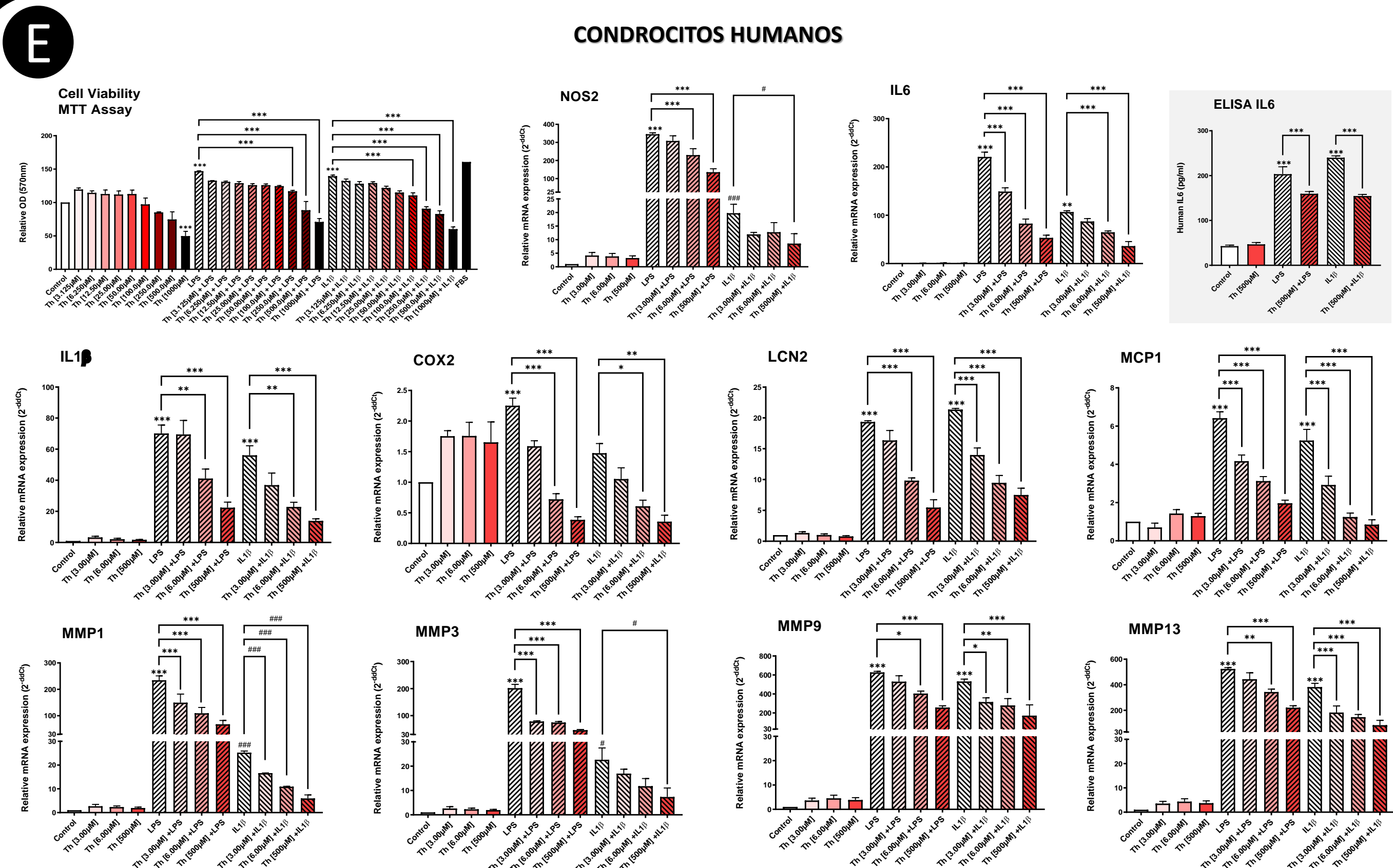


**Figura A.-** Posición 3D de anclaje de naloxona y talidomida a receptor TLR4 y su valor de afinidad cuantificada (Grid box x=17, y=27, z=35). A mayor afinidad, menor el valor. **B.-** Efecto de LPS y IL1B activando la respuesta inmune innata mediada por TLR4 y IL1R en condrocitos artrósicos humanos. Tanto la grafica Principal Component (PC) como el diagrama de Venn muestran tres proteomas distintos según el tratamiento recibido C.- Condrocitos artrósico humanos se estimularon con LPS [100ng/ml] y IL1B [0.1ng/ml] y se realizó un análisis masivo de su proteoma por MALDI/TOFF mostrando las vías de señalización estadísticamente (por FDR 5% y p-valor <0,05 ) aumentadas (rojo) o disminuidas (verde). Este análisis combina datos de Uniprot con algoritmos de clasificación y cuantificación relativa de FunRich software.

## NALOXONA



## TALIDOMIDA



**Figura D y E.-** Análisis de expresión génica (mRNA) por RT-PCR y de la proteína total secretable IL6 por ELISA de condrocitos artrósico humanos primarios estimulados con NLX y Th [1.4 – 100uM], NLX [100uM] y co-estimulados con LPS [100ng/ml] y/o IL1B [0.1ng/ml]. **Figura F y G.-** Análisis de expresión génica (mRNA) por RT-PCR y de la proteína total secretable IL6 por ELISA de sinoviocitos humanos estimulados con NLX y Th [1.4 – 100uM], NLX [100uM] y co-estimulados con LPS [100ng/ml] y/o IL1B [0.1ng/ml]. Graficas representan la media y error estándar de un mínimo de tres muestras experimentales independientes. La significancia estadística se ha determinado por One-Way ANOVA seguido de un post-test Tukey \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.