



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGIA

Evaluación del efecto de compuestos derivados de síntesis orgánica, sobre la viabilidad de *Leishmania braziliensis*.

Trabajo Especial de Grado

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por la bachiller Daznia L. Bompart B.

Tutor: Dr. Xenon Serrano-Martin.
Área de Salud. Instituto de Estudios Avanzados IDEA

CARACAS, REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA

Mayo-2012

AGRADECIMIENTOS

Primeramente gracias a Dios por estar siempre conmigo, bendecir e iluminar cada uno de los pasos que di, y por poner en mi camino a personas que han sido mi soporte y compañía durante todo mi período de estudio y vida.

A mis padres, Dazmia Berroterán y Alexis Bompert, por sacrificarse constantemente para mantenerme en pie, quienes son mi fuente de inspiración diaria, y por quien hoy veo logrado este sueño. No existen palabras para agradecer a estos seres tan maravillosos que me han dado la vida y me dan las fuerzas necesarias para continuar mi lucha.

A mi hermano, mis abuelos, tíos, tías y primos, que han estado apoyándome en todo y en cada momento, dándome fuerzas y ánimos de seguir para lograr lo que quiero. Gracias por todo lo que quiero, y sé que comparten esta felicidad y este triunfo conmigo.

A mi tía Dorkis Berroterán, que aunque está en el cielo, sé que siempre ha estado conmigo desde que vine al mundo. Te siento siempre. Gracias por cuidarme. Te quiero mucho.

A esas personas especiales, que han compartido de cerca las alegrías, tristezas, miedos, nervios, y otras emociones. A esas personas que siempre se tienen presente y que son más que un amigo. L.H., F.A., O.A., G.D., A.Z., W.C., Y.C. Los adoro.

A personas importantes como Yael García y Jorge Núñez, los cuales estuvieron en todos esos momentos maravillosos que viví realizando mi trabajo especial de grado. Gracias por todo y aun más por el cariño brindado, los quiero mucho.

A mi tutor Xenón Serrano-Martín por sus múltiples desvelos, consejos, aprendizaje, y cariño brindado a mi persona. Muchas gracias por todo, lo que se, te lo debo a ti. Fuiste mi guía, lo eres y lo seguirás siendo.

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria generada por algunas especies patógenas del género *Leishmania* spp. Según la OMS, esta enfermedad representa un grave problema de salud pública a nivel mundial. Debido a la ausencia de vacunas, el tratamiento de primera línea utilizado es la quimioterapia. Las drogas actualmente utilizadas son Glucantime y Anfotericina B, dos compuestos que generan graves efectos tóxicos a nivel cardíaco, renal y hepático. El alkillisofosfolipídico miltefosina, representa el mayor avance en el tratamiento de esta enfermedad, pero su teratogenicidad y el desarrollo de cepas resistentes ha limitado su uso. En búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, nuestro grupo de investigación pretende evaluar nuevos compuestos derivados de síntesis orgánica, que generen un potente efecto leishmanicida sobre promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, parásito que genera el 98% de los casos de Leishmaniasis cutánea en nuestro país.

INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
La leishmaniasis y su agente causal	2
Leishmaniasis y su distribución mundial	2
Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	5
Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis	9
Quimioterapia como tratamiento contra la leishmaniasis.	10
Tratamientos de primera línea contra la leishmaniasis.	10
Tratamientos de segunda línea contra la leishmaniasis.	11
Nuevas estrategias terapéuticas	14
Búsqueda de nuevos compuestos.	17
Derivados de Quinolinas	17
Derivados de Benzimidazol	19
OBJETIVOS	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
MATERIALES Y METODOS	26
Materiales	27
Compuestos	27
Parásitos y material biológico	31
Métodos	32
Cultivo celular y evaluación del efecto CMs y JCs seleccionados, sobre la viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> .	32
Determinación del efecto de CM100, sobre la alcalinización de acidocalcisomas en <i>Leishmania braziliensis</i> .	38
Determinación cualitativa del efecto de JC25, sobre la alcalinización de acidocalcisomas en <i>Leishmania braziliensis</i> .	40
Determinación del efecto del CM100 y JC25, sobre el contenido de esteroides libres en <i>Leishmania braziliensis</i> .	41

Infección de macrófagos BMDM y determinación del efecto del CM100 y JC25, sobre amastigotes intracelulares de <i>Leishmania braziliensis</i> _____	43
RESULTADOS _____	46
Capítulo I: Evaluación del efecto in vitro de derivados de Quinolinas (CMs) sobre la viabilidad de <i>Leishmania braziliensis</i>. _____	47
I.5 Determinación del efecto del CM100 sobre la biosíntesis de esteroides libres en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> . _____	53
I.6.- Determinación del efecto del CM100 sobre amastigotes intracelulares de <i>Leishmania braziliensis</i> . _____	57
Capítulo II: Evaluación del efecto in vitro de JCs sobre la viabilidad de <i>Leishmania braziliensis</i>. _____	59
II.1.- Evaluación del efecto de JCs sobre promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> , mediante MTT. _____	60
II.2.- Evaluación de la susceptibilidad a JC25 en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> , curvas de crecimiento. _____	61
II.3.- Determinación cualitativa del efecto del JC25 sobre el potencial electrogénico mitocondrial y acidocalcisomas en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> . _____	63
II.5.- Determinación del efecto del JC25 sobre amastigotes intracelulares de <i>Leishmania braziliensis</i> . _____	65
DISCUSION _____	68
CONCLUSIONES _____	80
PRODUCTOS OBTENIDOS _____	83
BIBLIOGRAFIA _____	90

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistemática y clasificación del género <i>Leishmania</i> spp. _____	3
Figura 2. Distribución geográfica de la leishmaniasis en el Mundo. _____	4
Figura 3. Distribución de la incidencia de casos de leishmaniasis en Venezuela por entidades federales. _____	6
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.. _____	8
Figura 5. Evaluación del efecto combinado, Amiodarona más Miltefosina sobre ratones BALb/c infectados con <i>L. mexicana</i> . _____	16
Figura 6. Estructura química del 8-(6-dietilaminohexi)amino-6-metoxi-4-metilquinolina. _____	19
Figura 7. Estructura general de los Benzimidazoles. _____	20
Figura 8: Susceptibilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> a CM100. _____	50
Figura 9: Efecto de CM100 sobre el potencial electroquímico de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> . _____	52
Figura 10: Efecto del CM100 sobre la alcalinización de acidocalcisomas en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> . _____	54
Figura 11: Fragmento de la ruta de biosíntesis de esteroides libres en <i>Leishmania</i> spp. _____	55
Figura 12: Efecto del CM100 sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de <i>Leishmania braziliensis</i> . _____	58
Figura 13: Susceptibilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> a JC25. _____	62
Figura 14. Determinación cualitativa del efecto del JC15 sobre el potencial electrogénico mitocondrial en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> . _____	64
Figura 15. Determinación cualitativa del efecto del JC15 sobre la alcalinización de acidocalcisomas en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> . _____	64
Figura 16: Efecto del JC25 sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de <i>Leishmania braziliensis</i> . _____	67
Figura 17. Estructura del derivado de quinolina CM100. _____	70
Figura 18. Estructura del derivado de benzimidazol JC25. _____	75

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructura de los derivados de quinolinas, sintetizados para este estudio.	29
Tabla 2. Estructuras de los derivados de benzimidazoles, sintetizados para este estudio.	31
Tabla 3. Filogenia del parásito utilizado en este estudio.	31
Tabla 4. Actividad citotóxica de los compuestos derivados de quinolinas (CMs).	49
Tabla 5: Efecto del CM100 sobre la biosíntesis de esteroides libres en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> .	56
Tabla 6. Actividad citotóxica de los compuestos derivados de benzimidazol (JCs).	61
Tabla 7. Efecto del JC25 sobre la biosíntesis de esteroides libres en promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> .	66

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis y su agente causal

La leishmaniasis es una enfermedad generada por parásitos eucarióticos unicelulares, monoflagelados, perteneciente al orden Kinetoplastidae, familia Trypanosomatidae, género *Leishmania* spp. El género *Leishmania* spp., está dividido en dos subgéneros, basados en el desarrollo del parásito en el intestino del insecto vector. De esta forma tenemos: el subgénero *Leishmania*, en el cual la forma promastigote se desarrolla en el intestino medio y anterior (región suprapylaria), y en el subgénero *Viannia*, en el cual los parásitos están restringidos al intestino posterior (región peripylaria) (Figura 1). Este parásito fue descrito en 1903 por Leishman, Donovan y Wright a partir de biopsias viscerales y cutáneas de enfermos de la India. Existen al menos veinte especies patógenas de *Leishmania* que son transmitidas de un hospedador a otro por la picadura de flebótomos infectados (clase Insecta, orden Díptera) por ende, la cadena epidemiológica de la enfermedad está conformada por el animal parasitado, el insecto vector y el sujeto susceptible (Alvar. 1997; Zuckermam y Lainson. 1987).

Leishmaniasis y su distribución mundial

La leishmaniasis es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como una de las 6 enfermedades tropicales mas importantes que afectan al hombre, encontrándose difundida en mas de 88 países, 4 continentes (Figura 2), con 350 millones de personas en riesgo, 12 millones de casos reportados con un índice de dos millones de nuevos casos anuales, así como 57.000 muertes reportadas al año (Alvar. 1997; Davis y Kedzierdki. 2005; Davies y col. 2005).

KINGDOM PROTISTA Haeckel, 1866
SUBKINGDOM PROTOZOA Goldfuss, 1817
PHYLUM SARCOMASTIGOPHORA Honigberg & Balamuth, 1963
SUBPHYLUM MASTIGOPHORA Deising, 1866
CLASS ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909
ORDER KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963, *emend.* Vickerman, 1976
SUBORDER TRYPANOSOMATINA Kent, 1880
FAMILY TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901, *emend.* Grobben, 1905

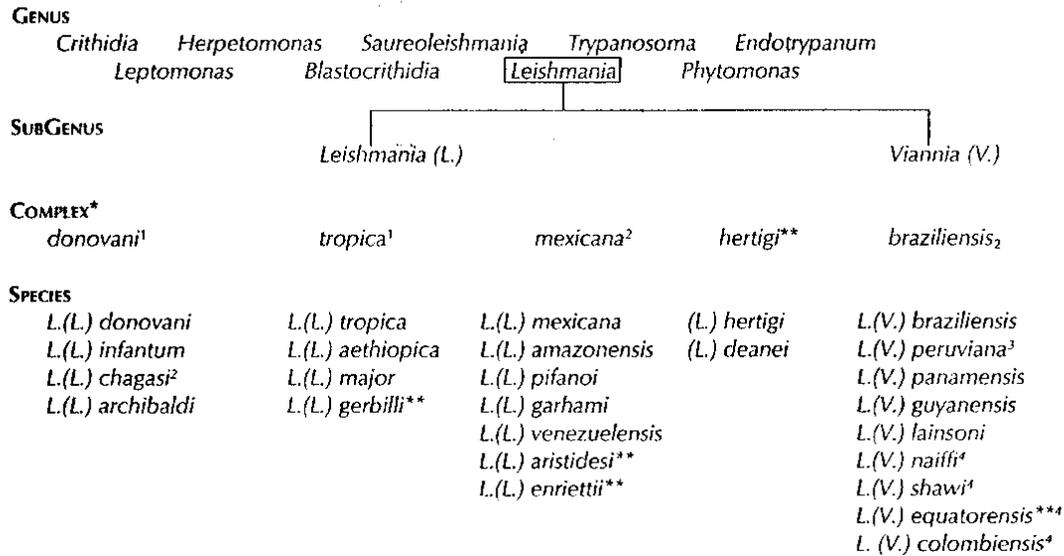


Figura 1. Sistemática y clasificación del género *Leishmania* spp. (Lainson y Shaw, 1987). 1: *Leishmania* del viejo mundo. 2: *Leishmania* del nuevo mundo. 3: *L. (V.) braziliensis* no ha sido sometido a análisis de RFLP. 4: Ha sido reorganizado como una nueva especie del subgénero *Viannia*. ** Término sin estatus taxonómico. ** no relacionada al hombre.

En diversas partes del mundo el incremento en los casos de leishmaniasis reportados es evidente. Este hecho está directamente relacionado con razones como: desarrollo de nuevos proyectos urbanísticos en zonas rurales donde ocurre el ciclo biológico natural del parásito, niveles agudos de mal nutrición en algunas zonas endémicas de países pobres, el mejoramiento de los métodos de

diagnóstico y aumento mundial en los niveles de VIH (SIDA) el cual permite tanto el desarrollo como el establecimiento de la enfermedad de manera más rápida y violenta (Desjeux. 2004).

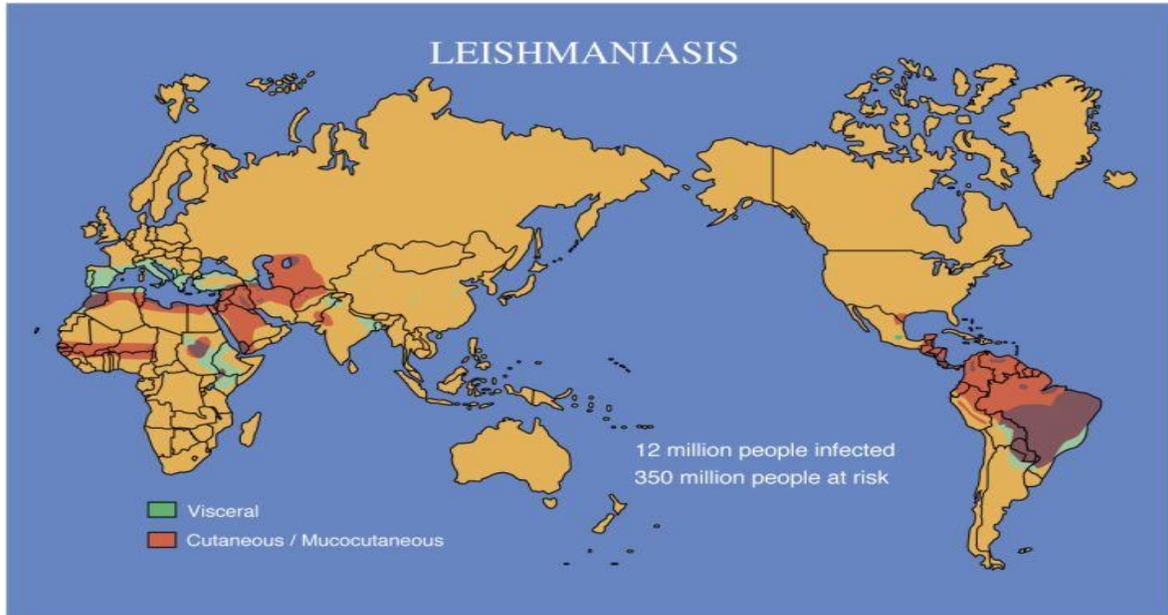


Figura 2. Distribución geográfica de la leishmaniasis en el Mundo (<http://www.who.int>).

Leishmaniasis en Venezuela

En Venezuela, la enfermedad tiene una distribución extensa exceptuando las regiones xerófilas (costa de Coro, Lagunillas, depresión de Lara y regiones por encima de 2.000 m. de altitud). Su mayor incidencia se observa en la selva amazónica, alto Orinoco, golfo de Paria, Cariaco, Cabo Codera, norte del Distrito Federal, región sur-occidental del lago de Maracaibo, sur de la barra de Maracaibo, zona de los Andes hasta los 2.000 metros de altura, Valles de Yaracuy

y Aragua, llanos occidentales y centrales, llanos orientales hasta el norte de Anzoátegui y Monagas (Figura 3).

Desde 1955 al 2002 el ministerio de salud registró cerca de 50.000 casos de leishmaniasis cutánea y más de 2.000 casos de leishmaniasis visceral. En el bienio 2008-2009, un total de 4.640 casos de las diferentes formas clínicas de leishmaniasis cutánea fueron diagnosticados en Venezuela, con una media de 2.320 casos por año, y una tasa promedio anual de 8,25 por 100.000 habitantes. Predomina el sexo masculino con una razón de masculinidad de 1,84 para el periodo en estudio. Se registraron casos en todas las edades, con predominio numérico en el grupo de 5 a 34 años y una edad promedio de 31,09 y 33,91 años para los años 2008 y 2009 respectivamente. En cuanto a la ocupación 22,39 % corresponde a personas del sector agropecuario, seguido de estudiantes con 20,88% de los casos. Se registraron casos en todas las entidades federales del país, menos en Nueva Esparta. En este periodo, los estados con mayor número de casos fueron Lara con 910 (19,61%), Miranda con 650 (14,01%) y Táchira con 488 (10,52%). En cuanto a las formas clínicas se observó un predominio franco de la leishmaniasis cutánea localizada con 97,84% de los casos generada por *Leishmania braziliensis*. (De Lima y col. 2011)

Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

El ciclo de vida de *Leishmania* spp. es digenético, debido a que este se alterna entre dos hospedadores, uno invertebrado y otro vertebrado.

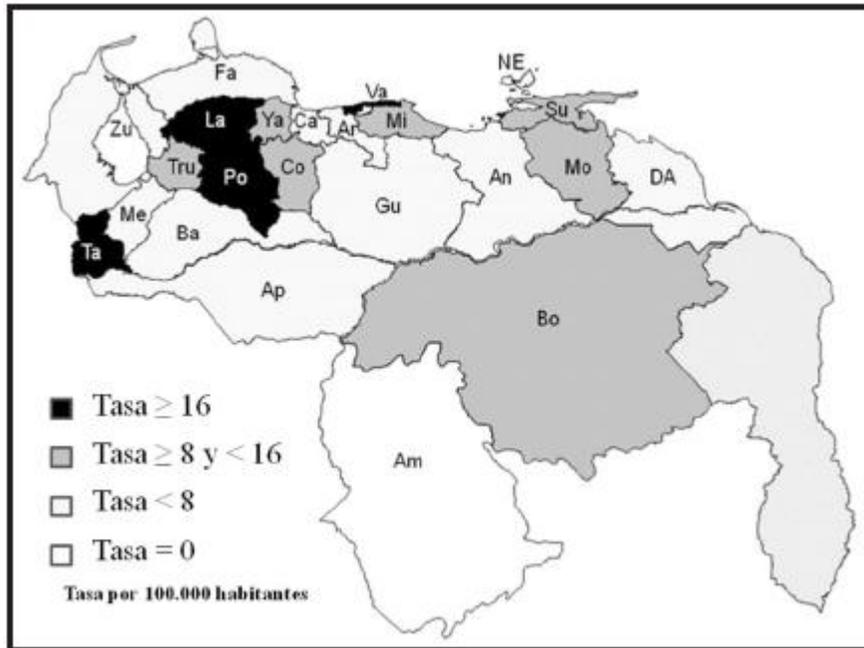


Figura 3. Distribución de la incidencia de casos de leishmaniasis en Venezuela por entidades federales. Tasa por cien mil habitantes, bienio 2008-2009 (De Lima y col. 2011).

En el hospedador invertebrado, el parásito se presenta bajo un morfotipo denominado promastigote el cual es alargado y con flagelo. En el hospedador vertebrado y luego de ser englobado por los macrófagos del sistema inmunitario del mismo, el parásito se transforma en un morfotipo denominado amastigote, el cual es redondeado y sin flagelo aparente. Cabe destacar que el amastigote intracelular es el estadio clínicamente importante de la leishmaniasis ya que es el responsable de todos los síntomas de la enfermedad en el hospedador mamífero infectado, por ende cualquier estrategia quimioterapéutica alternativa debe enfocarse en la eliminación de este estadio parasitario (Peters y Killick-Kendrick. 1987).

Profundizando un poco, en el hospedador invertebrado se presentan formas promastigotes, caracterizadas por poseer un cuerpo alargado, núcleo, quinetooplasto anterior del que parte un corto axonema continuándose en un flajelo y miden de 15 a 20 μm de largo por 2 a 4 μm de ancho. En el hospedador vertebrado predominan las formas intracelulares amastigote que parasitan macrófagos, en donde se dividen por fisión binaria. Este morfotipo, se presenta como corpúsculos ovoides o esféricos conteniendo un núcleo y un quinetooplasto del que parte un axonema que no sobrepasa la pared del cuerpo celular; miden de 2 a 6 μm de largo por 1.8 a 4 μm de ancho (Díaz. 1960; Bofante y Barroeta. 2002).

La infección del insecto (Figura 4), ocurre cuando la hembra aborda a un vertebrado infectado, ingiriendo con la sangre macrófagos parasitados por las formas amastigote, los cuales son liberados de los macrófagos transformándose rápidamente en promastigotes. Estos se multiplican en el tracto digestivo del invertebrado, para posteriormente migrar hacia su probóscide donde estarán disponibles para ser inoculados al nuevo hospedador mamífero, en la siguiente ingesta de sangre (Molyneux y Killick-Kendrick. 1987).

Una vez dentro del macrófago, los parásitos rodeados por una vacuola fagocitófora, se transforman en amastigotes y se multiplican, luego de resistir la actividad del macrófago que intenta eliminarlos, mediante una cascada de metabolitos derivados de oxígeno (óxido nítrico e hidrolasas lisosomales).

Los macrófagos cargados de amastigotes se lisan y los parásitos reinfectan otras células. El ciclo se cierra cuando otro insecto ingiere macrófagos del mamífero infectado (Mendoza-León y col. 1996).

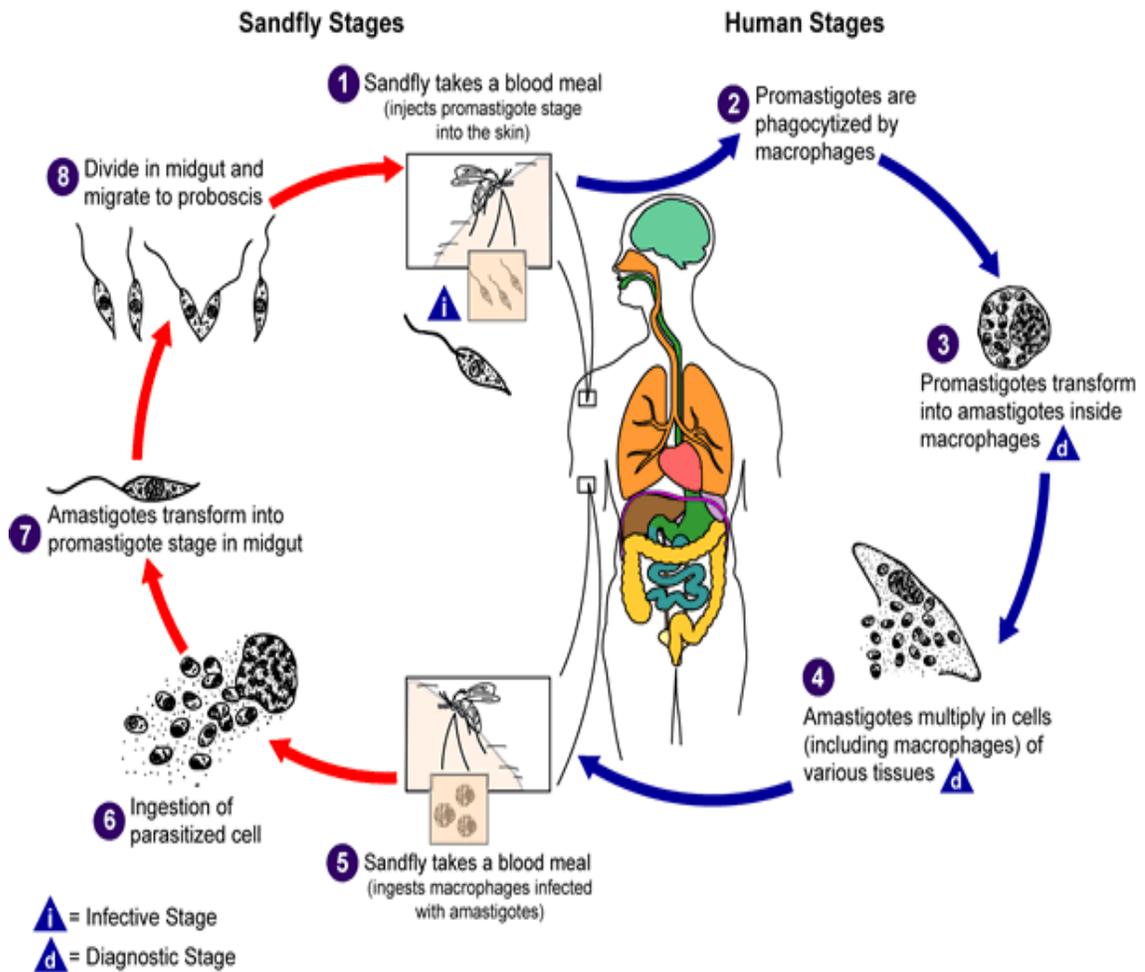


Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (www.dpd.cdc.gov).

Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis

Según la especie del parásito, se generan diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniasis, a saber:

1.- Leishmaniasis cutánea (LC). Es generada por parásitos de las especies: *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, y *L. panamensis* y *L. braziliensis*. Las lesiones desarrolladas forman úlceras cutáneas caracterizadas por un proceso inflamatorio con macrófagos infectados de parásitos, una reacción granulomatosa incompleta y un centro de tejido necrótico (Leiby y col. 1994).

2.- Leishmaniasis mucocutánea (LMC). Considerada como una enfermedad del nuevo mundo, es causada por parásitos de las especies *L. braziliensis* y *L. panamensis*, los cuales tienen un alto tropismo por las zonas mucosas de los organismos parasitados. Esta manifestación se caracteriza por presentar una alta hipersensibilidad retardada y una marcada respuesta proliferativa de linfocitos (Marsden. 1986). Las lesiones son crónicas y necróticas, con pocos parásitos por macrófago (Marsden. 1986). En estos pacientes se produce destrucción de cartílagos nasales y del paladar blando, ocasionando mutilaciones extensas de los tejidos adyacentes. Posteriormente puede afectarse la faringe, laringe y tráquea, incluso la mucosa genital (Marsden. 1986).

3.- Leishmaniasis Visceral o Kala Azar (LV). Es provocada por tres especies de parásitos: *L. donovani*, *L. chagasi* y *L. infantum* (Leiby y col. 1994). En la LV el parásito invade órganos internos (bazo, hígado y médula ósea), lo cual trae

consecuencias usualmente fatales si no es tratada a tiempo (Mendoza-León y col. 1996).

Quimioterapia como tratamiento contra la leishmaniasis.

A pesar de los diversos esfuerzos dirigidos a la generación de vacunas contra la leishmaniasis a nivel mundial, actualmente la quimioterapia es el tratamiento más efectivo contra esta parasitosis (Ghalib y Modabber. 2007).

Los principales tratamientos a base de drogas recomendados tanto para la leishmaniasis visceral, como para la leishmaniasis cutánea y mucocutánea, fueron por primera vez introducidos en los años 50s. No sólo *Leishmania* spp difiere intrínsecamente en términos de su sensibilidad a drogas sino también, los sitios de desarrollo de la infección tanto de leishmaniasis cutánea, como visceral imponen diferentes requerimientos farmacocinéticos al momento de usar la droga en cuestión (Alvar. 1997).

Tratamientos de primera línea contra la leishmaniasis.

Según Berman (1989) y Pandey y col. (2005), se han seleccionado una serie de drogas pertenecientes al grupo de los antimoniales pentavalentes como primera línea de tratamiento para los diversos tipos de leishmaniasis: antimoniato de meglumina (Glucantime) y estibogluconato de sodio (Pentostan). El efecto de estas drogas se debe a la transformación de su estado pentavalente a trivalente (estado activo), sin embargo, el mecanismo específico de acción de estas drogas no ha sido caracterizado totalmente. Por otra parte está ampliamente demostrado que estos fármacos generan graves efectos secundarios a nivel renal, cardíaco y

hepático, anorexia, náuseas, vómitos, entre otros. La vía de administración de las sales antimoniales pentavalentes es parenteral: intramuscular o intravenosa, lo cual también complica el tratamiento, dada la necesidad de dirigirse a un centro asistencial especializado para tal fin (Bofante y Barroeta. 2002).

Otra alternativa interesante la representa una novedosa composición liposomal del antimonial Pentostan (SAG-PCSA) presentada por Pal y col. (2004), la cual genera una alta actividad leishmanicida sobre *Leishmania donovani* tanto *in vitro* como *in vivo*, con un mínimo de efectos secundarios asociados. Sin embargo, un elevado costo monetario ha limitado su aplicación.

Haciendo de lado su toxicidad, los antimoniales han sido efectivos en el tratamiento de la enfermedad, representando la primera alternativa terapéutica en regiones endémicas por más de 60 años. Para mantener su efectividad se ha incrementado la concentración y duración del tratamiento con el pasar de los años, generando importantes fenómenos de resistencia parasitaria, los cuales han sido reportados en el Sur de Europa, Irán, Sur-América y noreste de India (Fasel y Myler. 2008).

Tratamientos de segunda línea contra la leishmaniasis.

Algunas drogas alternativas denominadas de segunda línea, como el antibiótico poliénico anfotericina B en el caso de la leishmaniasis visceral y la diamidina pentamidina en el caso de la leishmaniasis cutánea, han sido ensayadas en el tratamiento de esta enfermedad, a pesar de ser altamente costosas, de escasa disponibilidad y tóxicas (Ouellette y Borst. 1995; Lira y col.

1999; Thakur. 1999; Davies y col. 2005). Sin embargo, la quimioterapia antileishmánica se ha beneficiado por el desarrollo de formulaciones de anfotericina B asociados a lípidos tales como Ambison[®], Albecet[®] y Amphocil[®], las cuales presentan una menor toxicidad y mayor tiempo de vida media en el plasma, en comparación con la droga parental usada para el tratamiento de infecciones por hongos. Estas composiciones liposomales de anfotericina B poseen todas las pruebas clínicas para leishmaniasis visceral y leishmaniasis mucocutánea; sin embargo, el elevado costo ha limitado ampliamente su aplicación (Meyerhoff. 1999; Petit y col. 1999; Sundar y col. 2001; Davis y Kedzierdki. 2005).

El mecanismo de acción de la AnF B es mediante la unión al ergosterol, presente en la membrana del parásito, y se reporta que forma poros o canales en la misma afectando gravemente la viabilidad del patógeno (Bofante y Barroeta. 2002). Entre los efectos secundarios producidos por la AnF B se encuentran: fiebre, escalofríos, tromboflebitis y efectos hematológicos; del mismo modo se tienen reportes de resistencia al fármaco lo cual limita el tratamiento (López. 2000).

Por otra parte la pentamidina, compuesto orgánico que posee dos grupos amidina o guanilo, ha demostrado tener actividad tripanocida y leishmanicida tanto *in vitro* como *in vivo* (Bofante y Barroeta. 2002). Para el mecanismo de acción de la pentamidina la teoría más aceptada ha sido la inhibición de la topoisomerasa mitocondrial (Kramp y col. 2005). Otra hipótesis está relacionado con la interferencia de diamidinas aromáticas (ej. berenil y pentamidina) sobre sistemas

de transporte poliamínicos, biomoléculas de importancia en varios procesos bioquímicos de la fisiología celular (Basselin y col. 2000). El mecanismo molecular está asociado a la inhibición no-competitiva de la captación de poliaminas (ej. espermidina, espermina, putrescina e arginina) e inhibición directa de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC), enzima comprometida en la biosíntesis de la espermidina (Gil y col. 2007).

Este fármaco está disponible sólo por vía parenteral y con frecuencia produce efectos adversos tales como: taquicardia, hipotensión, náuseas, vómitos, mareos, exantema, enrojecimiento facial y sabor metálico (Berman. 1988; Aden y col. 1995). En el 6% a 9% de los pacientes produce hipoglucemia como resultado de la destrucción de las células del páncreas, y excepcionalmente hiperglicemia y diabetes mellitus (Gorgl y col. 1992; Altés y col. 1991).

Uno de los mayores avances en el campo de la quimioterapia contra la leishmaniasis lo representa el alquil-lisofosfolípido de administración oral miltefosina, el cual a pesar de tener una alta efectividad presenta una importante desventaja que es su teratogenicidad, lo cual limita su aplicación a mujeres embarazadas.

Este fármaco, fue validado para el tratamiento de leishmaniasis visceral en la India, Colombia, Guatemala y España (Croft y Engel. 2006; Machado y col. 2010). Recientemente, la eficiencia clínica de la miltefosina sobre leishmaniasis cutánea en el nuevo mundo, fue investigada en ensayos conducidos en Centro y Sur de América. Fue demostrado que las tasas de curación son variables entre

especies de *Leishmania* spp, a saber: *L. panamensis* 82%, *L. mexicana* 60% y *L. braziliensis* 33% (Machado y col. 2010).

Respecto a su mecanismo de acción sobre tripanosomatideos, se determinó que en *Trypanosoma cruzi*, genera la inhibición de la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina a través de la inhibición específica de la enzima fenil-N-metiltransferasa alterando la ruta de transmetilación de Brenner-Geenberg en estos parásitos (Lira y col. 2001).

En *Leishmania* spp. los estudios referentes al mecanismo de acción son escasos. Sin embargo, Lux, H. y col. (2000) proponen que la miltefosina inhibe específicamente el proceso de alquilación de la enzima acil-CoA transferasa, la cual es clave en los procesos de remodelación de diversos éter-lípidos de la membrana de este género de parásitos. Serrano-Martín 2009b, demostró que la miltefosina inhibe la síntesis de 5-dehidroepisterol afectando la actividad de la enzima escualeno epoxidasa, probablemente provocando una apertura del canal de Ca^{+2} tipo L.

Nuevas estrategias terapéuticas

Teniendo en cuenta los diversos efectos adversos de las drogas de primera línea, sus rutas de administración y elevados costos de tratamiento en algunos casos; en la actualidad se proyectan nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la leishmaniasis.

Una de las estrategias de estudio terapéutico contra la leishmaniasis, viene representada por la evaluación del efecto parasiticida de diversos fármacos previamente aprobados para el tratamiento de patologías humanas. En este sentido, existen reportes de evaluaciones de fármacos alternativos tales como: Glibenclamida, Amiodarona, entre otros.

La Glibenclamida es un inhibidor de canales de K⁺ y P-glicoproteínas, utilizado para el tratamiento de humanos con diabetes tipo II. Se ha demostrado que este efecto inhibitorio, promueve la disminución de los niveles de infección y multiplicación de *L. mexicana in vitro*. (Ponte-Sucre y Mendoza-León. 2001). Posteriormente se evidenció que la Glibenclamida reduce la tasa de crecimiento de las lesiones cutáneas en ratones BALB/c infectados con *Leishmania mexicana* (Serrano-Martín y col. 2006). Este grupo de investigación, realizó un tratamiento combinado a base de Glibenclamida y Glucantime en ratones infectados, observando que el efecto sobre las lesiones fue mayor al generado con el tratamiento individual, a base de cada uno de los fármacos. Mas resaltante aún, fue la capacidad que presento este tratamiento combinado para reducir las lesiones generadas por parásitos de esta especie, que presentaban resistencia cruzada a Glibenclamida y Glucantime.

Otro ejemplo en este sentido, viene dado por la Amiodarona. Este fármaco, es un antiarrítmicos tipo III, ampliamente utilizado en la actualidad para el tratamiento de diversas miocardiopatías en humanos. Serrano-Martín y col. 2009a; demostraron que la amiodarona inhibe potentemente la viabilidad de

promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania mexicana*. Del mismo modo, se demostró que este fármaco es capaz de afectar la homeostasis de Ca^{2+} en mitocondrias y acidocalcisomas, así como inhibir la biosíntesis de esteroides de membrana, en estos parásitos.

Teniendo en cuenta lo anterior, Serrano-Martín y col. 2009b demostraron que un tratamiento combinado a base de Amiodarona más Miltefosina (50mg/kg/día- 20mg/kg/día, vía oral), genera un potente efecto sinérgico sobre la evolución de lesiones en ratones BALB/C infectados con *L. mexicana*, efecto este que además, fue mayor al producido con Glucantime aplicado de manera individual (100 mg/kg/día, vía intraperitoneal) (Figura 5). Se demostró también que estos ratones fueron curados parasitológicamente a través de ensayos de PCR altamente específicos y sensibles (Serrano-Martín y col. 2009b).

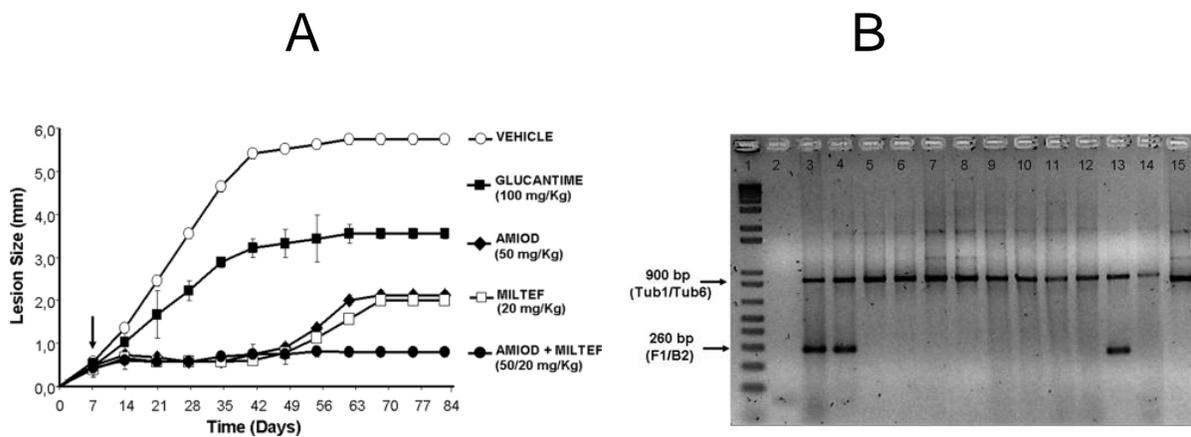


Figura 5. Evaluación del efecto combinado, Amiodarona más Miltefosina sobre ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*. (A). Evolución de las lesiones de ratones infectados con amastigotes de *L. mexicana*, tratados con amiodarona y miltefosina (individual y en combinación). (B). Evaluación de la cura parasitológica en ratones BALB/c infectados con *Leishmania* y tratados con amiodarona mas miltefosina, a través de un múltiple ensayo de PCR (Serrano-Martin y col. 2009b).

En paralelo con esta estrategia se vienen desarrollando a nivel mundial líneas de investigación basadas en el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad leishmanicida, utilizando estructuras de origen natural o sintético.

Búsqueda de nuevos compuestos.

Teniendo en cuenta que la leishmaniasis es una enfermedad habitualmente rural y sub-urbana que afecta a personas con limitados recursos económicos, resulta imperiosa la necesidad de llevar adelante estudios en la búsqueda de drogas alternativas con actividad leishmanicida que sean económicas, seguras y de fácil administración.

Tomando todo esto en cuenta, muchos grupos de investigación en el mundo están interesados en la evaluación de drogas sintetizadas orgánicamente, partiendo de estructuras previamente reportadas en la bibliografía, por su capacidad de afectar la viabilidad de otros organismos similares a los tripanosomatideos.

Sendos ejemplos de lo anteriormente comentado, lo representan la síntesis y evaluación de derivados de Quinolinas y Benzimidazoles, los cuales se discutirán a continuación.

Derivados de Quinolinas

Antes del descubrimiento de América, los indios peruanos utilizaban la corteza del árbol de la quina para tratar la malaria. El primer reconocimiento oficial

de la quina como ente farmacológico se realizó en 1677, cuando se incluyó en una edición de la Farmacopea de Londres como “Cortex peruanus”.

En la búsqueda de antimaláricos sintéticos, se continuó investigando hasta que en 1924 se logró la síntesis de la panaquina, primer antimalárico sintético efectivo contra esta enfermedad. Su actividad fue notable, sesenta veces mayor que la generada por la quinina contra el paludismo en animales experimentales (Rodríguez. 1994).

En este orden de ideas Martínez-Martínez, A. en el año 2005, realizó la síntesis orgánica de quinonas y compuestos relacionados, tomando en cuenta reportes previos de síntesis del núcleo de naftoquinona. Algunos de estos compuestos presentaron actividad biológica, a saber: actividad antimalárica, antisorriática, antitumoral y contra la lepra.

Actualmente muchos de los agentes terapéuticos utilizados contra infecciones bacterianas, malaria, mal de Chagas y leishmaniasis, son drogas que contienen en su estructura núcleos Quinolinícos (Moore y Czerniak. 1981).

Marecki y Bambury (1984), evaluaron la actividad antibacterial de una serie de derivados de 4-aminoquinolina, mediante ensayos *in vitro* con una serie de microorganismos, tales como: *Echerichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphilococcus aureus*, etc. Estos derivados de 4-aminoquinolina presentaron una notable actividad antibacterial contra estos microorganismo, garantizando su mortalidad a bajas concentraciones.

de la molécula. Tomando en cuenta lo anterior, diferentes análogos con grupos clorina, hidroxil, ariloxy y grupos metoxy fueron sintetizados, teniendo en cuenta que en la mayoría de los casos, estos grupos eran los responsables de la actividad antimalárica, antimico-bacterial y citotóxica de algunos compuestos (Camacho y col. 2011).

En este orden de ideas, los Benzimidazoles son compuestos con un sistema bicíclico, que contienen un anillo de benceno fusionado a un anillo con dos heteroátomos: azufre ó nitrógeno. Las ventajas de esta síntesis con respecto a otras reportadas, son su simplicidad, rendimientos elevados y su versatilidad dado que R1 puede ser un átomo de hidrógeno, un fenil o un naftil y X un oxígeno o un azufre (Camacho y col. 2011) (figura 7). Distintos grupos aportaran al producto final, diversas propiedades dependiendo de cuál sea el objetivo del estudio. Por lo tanto, es posible sintetizar una gran variedad de derivados de Benzimidazoles, potencialmente activos contra diversos organismos (Figura 7).

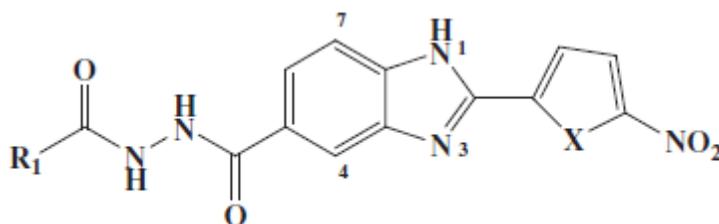


Figura 7. Estructura general de los Benzimidazoles (Camacho y col. 2011).

Un hecho notable es que, la estructura química/molecular del Benzimidazol es privilegiada en el campo de la química médica, ya que varios compuestos

sintetizados a partir de esta, exhiben actividad biológica notable (Boiani and González. 2005; Pérez-Villanueva y col. 2011; Welsch y col. 2010). En este sentido, Camacho y col., 2011, reportan la síntesis de derivados de nitrofuranos y nitrotiofenos incorporados a benzimidazol y carbohidrazidas incrementando con esto la actividad antimalárica y antitubercular de los compuestos resultantes, respecto a los parentales (Camacho y col., 2011).

Boiani y col. (2009), evaluaron la actividad citotóxica de una serie de derivados de 2H-benzimidazol 1,3-dioxido, mediante ensayos *in vitro*, sobre *L. braziliensis*. Estos derivados presentaron una notable actividad leishmanicida contra promastigotes de esta especie de parásitos.

Teniendo en cuenta que algunos de los derivados de benzimidazoles (derivados de 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol, 2H-benzimidazol 1,3-dióxido e híbridos de benzimidazol-pentamidina) y quinolinas (4-aminoquinolina y 8-aminoquinolina) presentan actividad biológica sobre *Leishmania* spp. (Hernández y col. 2010; Boiani y col. 2009; Torres y col. 2008), sería interesante investigar el presunto efecto leishmanicida de los mismos, sobre *L. braziliensis* específicamente.

En este sentido, en el presente trabajo evaluamos la actividad de 14 derivados de Benzimidazoles y 13 derivados de quinolinas, sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*. Del mismo modo determinamos el mecanismo de acción molecular de los compuestos seleccionados, con la finalidad de aportar nuevo conocimiento de base en el

estudio de compuestos alternativos para el futuro tratamiento de la leishmaniasis en nuestro país y el mundo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Tomando en cuenta lo antes planteado, es de nuestro interés evaluar el efecto de derivados de Quinolinas (CMs) y Benzimidazoles (JCs) sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*. Del mismo modo, nos planteamos estudiar el mecanismo de acción antiparasitario de los compuestos seleccionados, así como su relación con la bioenergética celular y la biosíntesis de esteroides en *Leishmania braziliensis*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el efecto citotóxico de CMs y JCs sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis* y macrófagos BMDM, mediante estimaciones con MTT.
2. Evaluar el efecto antiparasitario de CMs y JCs seleccionados, sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, mediante la realización de curvas de crecimiento parasitario *in vitro*.
3. Determinar el efecto de CMs y JCs seleccionados, sobre el potencial de membrana mitocondrial de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, mediante mediciones fluorimétricas con Rodamina 123
4. Determinar el efecto de CMs y JCs seleccionados, sobre la alcalinización de acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, mediante mediciones fluorimétricas con Naranja de Acridina.

5. Analizar el efecto de CMs y JCs seleccionados, sobre el contenido de esteroides libres de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.
6. Determinar el efecto de CMs y JCs seleccionados, sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*, mediante la realización de infecciones experimentales *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Reactivos

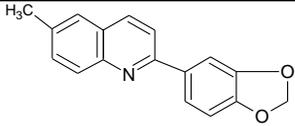
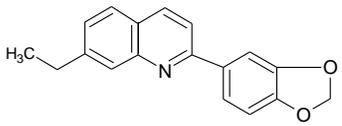
Todas las soluciones se prepararon con reactivos adquiridos en las casas comerciales SIGMA, Promega, Invitrogen, Gibco B.R.L. y BIO-RAD. Las soluciones y el material se esterizaron en un autoclave a 121 °C, 15 libras, durante 15 minutos.

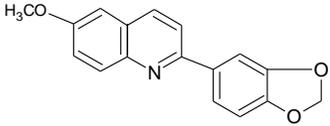
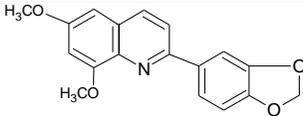
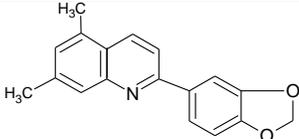
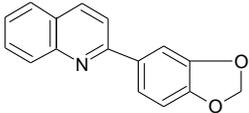
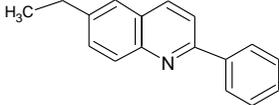
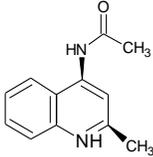
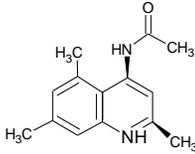
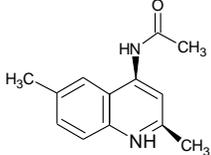
Fluoróforos

- **Rodamina 123** Molecular Probes (Eugene, OR)
- **Naranja de Acridina** Molecular Probes (Eugene, OR)

Compuestos

- Derivados de Quinolininas

Denominación del derivado	Estructura del derivado	Masa molecular del derivado (gr/mol)
CM147F-1		263,40
CM148F-2		277,11

CM149F-1		279,47
CM150F-1		309,31
CM151F-1		277,52
CM152F-1		249,29
CM100		233,31
CM282		204,87
CM300		232,32
CM360		218,29

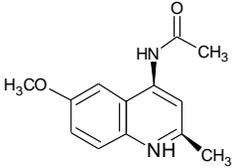
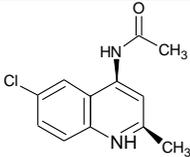
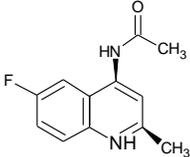
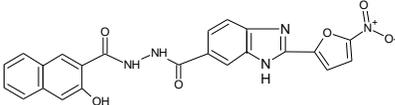
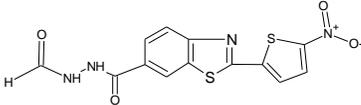
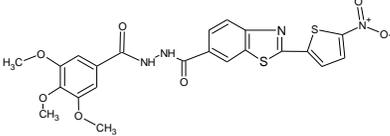
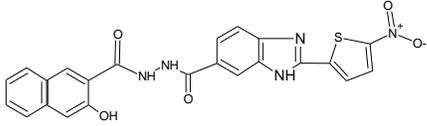
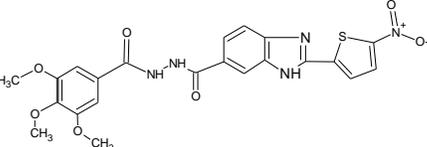
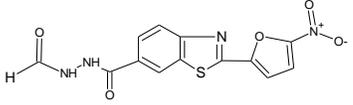
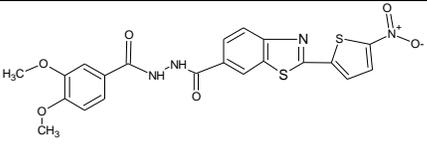
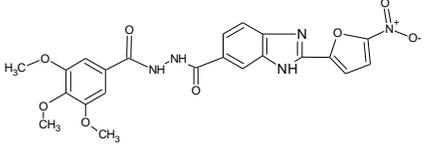
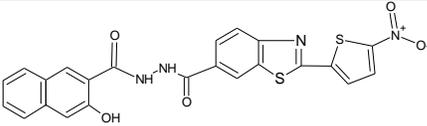
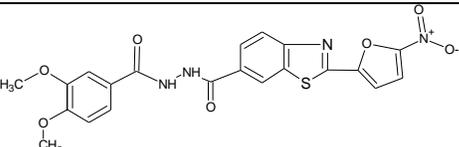
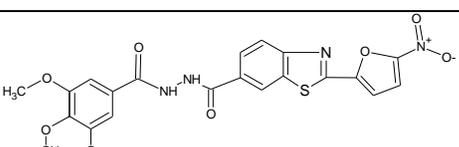
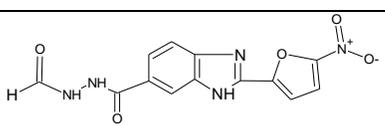
CM361		234,29
CM363		238,71
CM364		222,26

Tabla 1. Estructura de los derivados de quinolinas, sintetizados para este estudio. Amablemente cedidos por el por el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Colombia; a cargo del Dr. Vladimir Kouznetsov.

- Derivados de Benzimidazoles

Denominación del derivado	Estructura del derivado	Masa molecular del derivado (gr/mol)
JC25		457,40
JC27		348,36
JC15		514,53

JC42		473,46
JC50		497,48
JC53		332,29
JC16		484,50
JC19		481,41
JC28		490,51
JC31		468,44
JC35		498,47
JC43		315,24

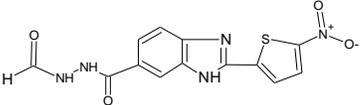
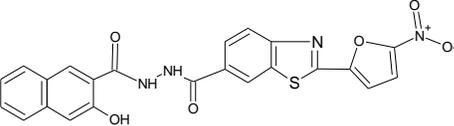
JC44		331,31
JC46		474,44

Tabla 2. Estructuras de los derivados de benzimidazoles, sintetizados para este estudio. Amablemente cedidos por el Laboratorio de Productos Orgánicos, Facultad de Farmacia, UCV Venezuela, a cargo del Dr. Jaime Charris

Parásitos y material biológico

Género (Subgénero)	Especie	Cepa	Origen
<i>Leishmania (V.)</i>	<i>braziliensis</i>	Bel 4	Venezuela

Tabla 3. Filogenia del parásito utilizado en este estudio.

Ratones BALB/c, 22 -25 gr de peso aproximadamente, obtenidos del Bioterio del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA).

Métodos

Cultivo celular y evaluación del efecto CMs y JCs seleccionados, sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

Los promastigotes de *Leishmania braziliensis* fueron aislados de lesiones generadas en ratones BALB/C previamente infectados. Una vez obtenida la muestra con los parásitos provenientes de la lesión y en condiciones de total esterilidad, se procedió a agregarlos en frascos de cultivo (T25) contenidos de: medio de cultivo (LIT) suplementado con Hemina (20 mg/L), Suero Fetal Bovino inactivado al 10% y amikacina (0,1 mg/mL), manteniéndose a temperatura ambiente (29°C).

Ahondando un poco más en el fundamento de la metodología, el medio LIT con Hemina, es un medio de cultivo de parásitos que contiene todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de los mismos. Este medio contiene: una solución orgánica (triptosa 15 gr/L, extracto de levadura 5 gr/L y extracto de hígado 2 gr/L) y una solución inorgánica ($C_6H_{12}O_6$ 4 gr/L, NaCl 9 gr/L, KCl 0,4 gr/L y Na_2HPO_4 7,5 gr/L). La amikacina, es un antibiótico que es transportado activamente al interior del citoplasma por un proceso dependiente de oxígeno. El gradiente electroquímico trans-membrana aporta la energía para este proceso y el transporte es acoplado a una bomba de protones. Una vez dentro del citoplasma, la amikacina se une de manera específica a la subunidad 30s ribosomal bacteriana, inhibiendo la síntesis de proteínas a través de varios mecanismos: 1) interfiere con la iniciación del complejo ribosomal (70s) durante la formación del

péptido; 2) induce de una lectura errónea del RNA mensajero con incorporación incorrecta de aminoácidos en el péptido, resultando en una proteína no funcional o tóxica; y 3) produce una separación de los polisomas en monosomas no funcionales. Esta actividad ocurre simultáneamente, siendo el efecto irreversible y letal solo para las bacterias. (Mella y col. 2004).

Otro componente esencial de este medio de cultivo es el Suero Fetal Bovino. El mismo, aporta algunos componentes necesarios para los procesos de división celular, y metabolismo del parásito. Es importante inactivar los factores de complemento presentes en este suero, ya que interactúan con el parásito afectando gravemente su viabilidad. Para ello, se procede a exponer el suero a 57°C por 45 min.

La preservación de los parásitos se llevo a cabo mediante congelamiento, para lo cual se procedió a alicuotar el cultivo en fase logarítmica de crecimiento en tubos estériles y se centrifugo durante 3 minutos a 1,8g. El sedimento, fue resuspendido entonces en 500µl de mezcla congelante, la cual contenía: 70% de medio Schneider's, suplementado con 20% de suero fetal bovino (inactivado) y 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO). Finalmente, se preservaron congelados a una temperatura de -80°C.

Con la finalidad de determinar de manera preliminar la actividad citotóxica de los compuestos a evaluar, procedimos a realizar el ensayo colorimétrico (MTT). Se colocaron, en una placa de 96 pozos, 200×10^3 promastigotes por pozo y se incubaron a 29 °C por 24 horas. Al transcurrir el tiempo previsto, se agregaron los compuestos a evaluar en una concentración única de 50µM.

Se sometieron los parásitos a 50 μ M de cada compuesto, como concentración de corte para realizar una evaluación preliminar y seleccionar aquellos compuestos activos sobre promastigotes de *L. braziliensis*.

Transcurridas 72 horas luego de agregados los compuestos a evaluar, se añadió MTT (1mg/ml), incubándose por 4 horas, en oscuridad. Finalmente las células fueron lisadas con isopropanol ácido y la placa fue leída en un espectrofotómetro a 530 nm.

Ahondando un poco en el fundamento de esta metodología; en parásitos vivos, se encuentra metabólicamente activa la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que metaboliza la sal de tetrazolium (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) generando como producto cristales de formazán los cuales, luego de ser solubilizados, pueden ser detectados a 530nm. Este tipo de reacciones colorimétricas, resultan muy útiles para realizar ensayos de viabilidad celular. La conversión solo se realiza en células vivas y la cantidad de formazán producido es proporcional al número de células presentes (Berridge y Tan. 1993).

Los compuestos seleccionados por su actividad leishmanicida, fueron evaluados en términos de su toxicidad sobre macrófagos BMDM, siguiendo la metodología explicada anteriormente. Todo esto, con la diferencia que en este caso, se expusieron los macrófagos a 100, 200 y 300 μ M de los compuestos seleccionados.

Basados en las estimaciones con MTT los compuestos seleccionados para este trabajo especial de grado fueron: CM100 (derivado de quinolina) y JC25

(derivado de benzimidazol). Seguidamente, estos compuestos fueron evaluados mediante la construcción de curvas de crecimiento parasitario *in vitro*.

Inicialmente, se observaron los parásitos al microscopio, con la finalidad de percatarnos en qué estado se encontraban éstos y así descartar cualquier tipo de contaminación existente. Luego, se procedió a realizar una dilución adecuada de los parásitos, a fin de obtener un número apropiado para su conteo. La dilución del cultivo se llevó a cabo en tubos cónicos, a los cuales se les añadió un volumen de buffer PBS estéril, y formaldehído al 0,1 mg/mL de concentración final. Finalmente se agregó, un volumen adecuado de parásitos (según la dilución estimada) provenientes del cultivo original y se procedió a contar en cámara de Neubauer. La determinación de la cantidad de parásitos/mL, se realizó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Par/ml} = \frac{\# \text{ total de parásitos}}{4} \times \text{factor de dilusion} \times 10^4$$

Las curvas de crecimiento y dosis respuesta de estos parásitos en presencia y ausencia del CM100 y JC25, se realizaron de la siguiente manera: primero, se agregaron 1×10^6 cel/mL en frascos de cultivo con 5 mL de medio LIT-hemina, suplementado con suero fetal al 10% inactivado y amikacina 0.1 mg/mL, según lo reportado por Serrano-Martín y col. 2006, con modificaciones menores.

Seguidamente, y 24 horas después, se procedió a agregarle a cada frasco diferentes concentraciones de los compuestos de interés (CM100 y JC25), disueltos en DMSO (0.1% final), incluyendo un control del experimento al cual no

se le agregó compuesto alguno. Se realizaron 3 experimentos independientes con cada concentración de compuesto, contándose así cada condición experimental por triplicado, por razones estadísticas.

La proliferación celular se determinó diariamente, mediante contaje directo en cámara de Neubauer, hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo.

Con los datos obtenidos a las 72 horas de incubación (lo cual habitualmente representa la fase exponencial de crecimiento de los parásitos). Se realizó una curva dosis-respuesta con estos datos y fue posible graficar el título relativo de los parásitos (respecto al control no tratado), contra las concentraciones de compuesto utilizadas.

Con la construcción de esta curva, se determinó la concentración efectiva de cada compuesto que inhibe la proliferación del 50% de la población de los parásitos en estudio (EC_{50}). Esta concentración de compuesto se obtuvo mediante el método de interpolación lineal propuesto por Huber y Koella (1993) y la siguiente fórmula matemática:

$$\text{Log } (EC_{50}): \text{Log } (X_1) + \left\{ \frac{[(Y_1) - (Y_0/2)]}{Y_1 - Y_2} [\text{Log } (X_2) - \text{Log } (X_1)] \right\}$$

Seguidamente procederemos a explicar la metodología utilizada para determinar el mecanismo de acción de cada compuesto seleccionado sobre *L. braziliensis*.

Determinación del efecto de CM100, sobre el potencial de membrana mitocondrial en *Leishmania braziliensis*.

Para la realización de este ensayo, utilizamos el fluoróforo Rodamina 123, el cual presenta un pico máximo en su espectro de excitación a 488 nM y un pico máximo en su espectro de emisión a 530nM. Este fluoróforo tiene la capacidad de intercalarse entre las membranas externa e interna de la mitocondria de los parásitos, lo cual nos permitió monitorear las variaciones en el potencial electrogénico del organelo debido al efecto del CM100. Inicialmente, se tomó del cultivo 5×10^5 promastigotes en un tubo cónico, luego se centrifugó el contenido a 600g. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1ml de buffer de carga ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (Fosfato monopotásico) 1/15 M + $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}_2$ (Fosfato disódico) 1/15 M). Seguidamente, y bajo las mismas condiciones anteriores, se lavaron los parásitos dos veces. Se resuspendió en 500 μl del buffer de carga y se agregó el fluoróforo a una concentración final de 5 μM . Se incubó la muestra a 29°C por 45 min. Esta temperatura resulta fundamental, ya que a la misma se desarrollan los promastigotes de esta especie de parásitos en el insecto vector poiquiloterma. Seguidamente, se centrifugó la muestra a 600g. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la muestra en 500 μl de buffer de carga. Finalmente, se colocó 500 μL de esta solución de parásitos en una cubeta de cuarzo, de 1mL de capacidad y 4mm de diámetro óptico, para realizar las mediciones correspondientes en un fluorímetro (Hitachi F-7000) (Serrano-Martín y col. 2009a).

Como control del experimento se utilizó el compuesto FCCP (carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, 2 μ M), el cual activa corrientes iónicas, despolarizando el potencial de membrana de la mitocondria mediante la activación de protones y corrientes de sodio (Na⁺) (Serrano-Martín y col. 2009a). Este efecto desestabiliza por completo el potencia electrogénico de la mitocondria, y fué comparado con el obtenido por el CM100. Este proceso se llevó a cabo a una temperatura de 29°C. Las condiciones en las cuales se realizaron los registros fueron: λ_{ext} 488 nm y λ_{em} 530 nm en un fluorímetro (Hitachi F-7000).

Determinación del efecto de CM100, sobre la alcalinización de acidocalcisomas en *Leishmania braziliensis*.

Para realizar estas mediciones se empleó el fluoróforo Naranja de Acridina (NA), el cual tiene la capacidad de acumularse en compartimientos acídicos tales como acidocalcisomas, de acuerdo con el potencial de H⁺ presente en los mismos. Para determinar el efecto del CM100 sobre el funcionamiento de los acidocalcisomas de *L. braziliensis*, nos basamos en que la acumulación del fluoróforo en los acidocalcisomas es medida por la extinción de la fluorescencia emitida a 530 nm, debida a la dimerización del compuesto. Para ello, se lavaron 3 veces los parásitos con el buffer de carga mencionado en la sección anterior. De manera similar a la explicada en la metodología anterior, estos parásitos fueron cargados con 2 μ M de Naranja de Acridina durante 5 minutos. La suspensión fue colocada dentro de una cubeta de cuarzo (500 μ l de volumen final) (Serrano-Martín y col. 2009a). Una vez iniciada la medición se permeabilizaron los promastigotes

utilizando Digitonina (1 μ M), con la finalidad de permitir el ingreso del fluoróforo, para posteriormente agregar CM100. Se utilizó como control positivo del experimento, Nigericina (2 μ M), el cual es un intercambiador H⁺/K⁺, capaz de alcalinizar por completo los acidocalcisomas, generando con esto, la liberación total del fluoróforo hacia el citoplasma. Este proceso se llevó a cabo a una temperatura de 29°C. Las condiciones en las cuales se realizaron los registros fueron: λ_{ext} 488 nm y λ_{em} 530 nm en un fluorímetro (Hitachi F-7000).

Determinación cualitativa del efecto de JC25, sobre el potencial de membrana mitocondrial en *Leishmania braziliensis*.

Para la realización de este ensayo, utilizamos el fluoróforo Rodamina 123. Este fluoróforo tiene la capacidad de intercalarse entre las membranas externas e interna de la mitocondria de los parásitos censando el potencial electrogénico del organelo, como se explicó anteriormente. La metodología utilizada en este caso, fue similar a la descrita anteriormente para CM100, con modificaciones menores (Serrano-Martín y col. 2009b).

Inicialmente, se tomó del cultivo 5x10⁵ promastigotes en un tubo cónico, y se centrifugó el contenido a 600g. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1ml de buffer de carga. Seguidamente, y bajo las mismas condiciones anteriores, se lavaron los parásitos dos veces. Se resuspendió en 500 μ l del buffer de carga mencionado en la sección anterior y se agregó el fluoróforo a una concentración final de 5 μ M. Se incubó la muestra a 29°C por 25 min. Seguidamente, se centrifugó la muestra a 600g. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la

muestra en 1200µl de buffer de carga. Se colocó 400µL de esta solución de parásitos en tres (3) tubos cónicos, con diferentes condiciones: solución de parásitos cargados sin exponerlos a ningún compuesto, solución de parásitos con JC25 a una concentración final de 50 µM y la solución de parásitos expuestos al control positivo, FCCP, a una concentración final de 2 µM (Serrano-Martín y col. 2009b).

Finalmente se colocaron 2 µL de cada condición en porta objetos, secando a 29°C, para luego observar la muestra en un microscopio de fluorescencia ZEISS observer.Z.1. Con este método, determinamos de manera cualitativa, el efecto de JC25 sobre el potencial electrogénico mitocondrial en promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

Determinación cualitativa del efecto de JC25, sobre la alcalinización de acidocalcisomas en *Leishmania braziliensis*.

Para realizar estas mediciones se empleo el fluoróforo Naranja de Acridina (NA). La metodología y fundamento utilizados en este caso, fueron similares a la descrita anteriormente para CM100, con modificaciones menores. Brevemente, se lavaron 3 veces los parásitos con el buffer de carga mencionado en la sección anterior, estos parásitos fueron cargados con 2µM de Naranja de Acridina durante 5 minutos. La suspensión fue dividida en tres (3) porciones, cada uno con diferentes condiciones: solución de parásitos cargados sin exponerlos a ningún compuesto, solución de parásitos con JC25 a una concentración final de 50 µM y la solución de parásitos expuestos al control positivo, Nigericina, a una

concentración final de 2 μM . La nigericina es un intercambiador H^+/K^+ , capaz de alcalinizar estos organelos, generando con esto, la liberación total del fluoróforo hacia el citoplasma del parásito (Serrano-Martín y col. 2009a).

Finalmente se colocaron 2 μL de cada condición en porta objetos, secando a 29°C , para luego observar en un microscopio de fluorescencia ZEISS observer.Z1., para luego visualizar el efecto pertinente de cada condición. Con este método, observaremos de manera cualitativa, el efecto de JC25 sobre la alcalinización de los acidocalcisomas en promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

Determinación del efecto del CM100 y JC25, sobre el contenido de esteroides libres en *Leishmania braziliensis*.

Inicialmente, se realizó la extracción de lípidos totales de promastigotes de *L. braziliensis* tratados y no tratados con CM100 y JC25. Brevemente, se realizaron cultivos de promastigotes (50 mL) tratados y no tratados con los compuestos. Los cultivos se mantuvieron por 5 días a 29°C . Luego, se centrifugaron a 720g por 15min, con la finalidad de eliminar el medio de cultivo. Este procedimiento se repitió 3 veces resuspendiendo el sedimento de parásitos en 50 mL de solución PBS. Finalmente, se resuspendió el sedimento en una solución Cloroformo-Metanol (2:1) provocando la ruptura de las membranas de los parásitos y la subsecuente separación de los lípidos totales (Serrano-Martín y col. 2009a).

La suspensión de lípidos obtenida, fué filtrada y luego concentrada mediante un rotaevaporador a 60°C, hasta la total evaporación de la solución Cloroformo-Metanol (2:1).

Seguidamente, se procedió a resuspender los lípidos obtenidos en 1 mL de Cloroformo. Esta muestra fue corrida en una columna de ácido silícico (1,5 x 4cm), con la finalidad de separar los lípidos neutros de los polares. Se procedió luego a eluir los lípidos neutros de la muestra agregando 3 volúmenes de cloroformo. Finalmente se concentraron las fracciones colectadas a través de un rotaevaporador a 60°C, hasta la total evaporación del la solución de Cloroformo.

Los lípidos neutros que se obtuvieron, fueron resuspendidos en 5 mL de cloroformo, luego fueron concentrados en atmosfera de Argón, con la finalidad de prevenir procesos de oxidación lipídica (Serrano-Martín y col. 2009a).

Finalmente, se procedió a inyectar 10 µL de cada fracción obtenida en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890A) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (Agilent Technologies 5975C). Mediante los espectros de gases y masas generados para cada muestra, se determinó la naturaleza, cantidad y subsecuente acumulación, de los intermediarios presentes en la ruta de síntesis de 5-dehidroepisterol en los promastigotes tratados con CM100 y JC25, respecto a los parásitos no expuestos a compuesto alguno.

Infección de macrófagos BMDM y determinación del efecto del CM100 y JC25, sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*

- Obtención y cultivo de fibroblastos de pulmón (L-929)

Se sacrificaron ratones BALb/C por dislocación cervical, extirpándose seguidamente ambos pulmones. Los pulmones se colocaron en una capsula de Petri, lavándose tres (3) veces con solución PBS. Se transfirieron luego a una cápsula de Petri con medio DMEM alto en glucosa y 20% de suero fetal bovino (SFB). El tejido se colocó en una solución de dispasa-colagenasa por 30 minutos a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido ese tiempo, se detuvo la reacción con suero fetal bovino, para luego disgregar mecánicamente. La suspensión resultante se agregó en un T-25 y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ por 48h. Luego de transcurrir este lapso de tiempo se retiró el medio junto con los tejidos no adheridos, agregando medio DMEM alto en glucosa y 20% de SFB, incubando nuevamente a 37°C y 5% CO₂ por 7 días. Transcurridos este tiempo el medio fue colectado para su posterior utilización como medio condicionado L-929.

- Cultivo de macrófagos de médula ósea de ratón (BMDM)

Inicialmente se extrajo el fémur de ratones BALb/C sacrificados por dislocación cervical. Una vez obtenido, se colocó en una placa de Petri con medio DMEM alto en glucosa y 20% de SFB. El material óseo fue seccionado entonces, extrayéndose la médula ósea de manera mecánica. Las células madres provenientes de la médula, fueron cultivadas en estas condiciones y en un medio selectivo denominado BMDM, el cual esta compuesto por: DMEM alto en glucosa,

20% de SFB y 30% de sobrenadante de células L-929 (fibroblasto de ratón) como fuente de factor estimulante del crecimiento de macrófagos (Marim, F. y col. 2010).

- Infección de macrófagos BMDM

Se preparo una solución de macrófagos BMDM y promastigotes de *L. braziliensis*, en una proporción 1:10, es decir por cada macrófago, 10 promastigotes de *L. braziliensis*. Posteriormente, se agregaron 60 μ L de esta mezcla sobre vidrios cubre objeto, ubicados en placas de 12 pozos. Para garantizar el proceso de infección y la fijación de los macrófagos a la superficie, se incubó por 6 horas a 37°C y 5% de CO₂ en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo, se procedió a agregar a cada pozo las concentraciones de CM100 y JC25 diluidas en 300 μ L de medio DMEM suplementado, incubándose por 96 horas en las mismas condiciones comentadas anteriormente. Para monitorear y contabilizar los macrófagos infectados y no infectados se utilizo la tinción Giemsa. (Brito, S. y col., 2006).

Se realizaron diversos controles del ensayo tales como: macrófagos infectados sin compuesto (control de infección del experimento), macrófagos no infectados sin compuesto (control de la fisiología de los macrófagos) y macrófagos no infectados con compuesto (control de la toxicidad de los compuestos sobre la célula hospedera).

Con los contajes en cámara de Neubauer que se obtuvieron a las 96 horas luego de agregados los compuestos, se procedió a elaborar una curva dosis-respuesta que expresa: (a) porcentaje total de macrófagos, (b) porcentaje de

macrófagos infectados y (c) número de amastigotes por macrófago; todos estos, respecto a concentraciones crecientes de los compuestos seleccionados.

RESULTADOS

**Capítulo I: Evaluación del efecto in vitro de
derivados de Quinolinas (CMs) sobre la viabilidad
de *Leishmania braziliensis*.**

I.1.- Evaluación del efecto de CMs sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*, mediante MTT.

Poblaciones de promastigotes de esta especie de parásitos fueron expuestos a una concentración única de 50 μ M de cada derivado, con la finalidad de evaluar la actividad parasiticida, mediante MTT. Los compuestos seleccionados para las siguientes fases de estudio fueron aquellos que inhibieron la proliferación celular en un 50% o más, comparado con el control sin droga. Seguidamente, los compuestos seleccionados fueron evaluados sobre macrófagos BMDM (en concentraciones de 100, 200 y 300 μ M), con la finalidad de comprobar la inocuidad de los mismos sobre la célula hospedera. El compuesto seleccionado en estas evaluaciones se muestra en la tabla 4. Cabe destacar, que para fases siguientes, fue seleccionado el derivado CM100 por poseer alta actividad antiparasitaria, alta inocuidad sobre la célula hospedera así como buenas condiciones de solubilidad y estabilidad en el tiempo.

I.2.- Evaluación del efecto de CM100 sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*, curvas de crecimiento.

Poblaciones de promastigotes de esta especie de parásitos fueron expuestos a diversas concentraciones de CM100 determinándose su viabilidad diaria por 5 días, a través de conteo directo (por triplicado cada condición) con cámara de Neubauer, respecto a una población de parásitos control no expuestos a droga alguna. Los resultados muestran (figura 8A) un efecto dosis dependiente de los parásitos hacia las concentraciones crecientes de CM100. Con los datos de

contaje a las 72h de cultivo (fase exponencial), se construyó una curva dosis respuesta. Con la construcción de esta curva, fue posible determinar la concentración de CM100 capaz de inhibir el 50% de la población celular en cultivo EC₅₀: 5,8μM (figura 8B).

Droga	EC₅₀ <i>L. Braziliensis</i> (μM)	EC₅₀ Macrófagos (μM)
CM 100	≤ 50	≥ 200
CM 110	≤ 50	≤ 100
CM 147	≥ 50	-
CM148	≥ 50	-
CM 149	≥ 50	-
CM 151	≥ 50	-
CM 152	≥ 50	-
CM 282	≥ 50	-
CM 300	≥ 50	-
CM 360	≥ 50	-
CM 361	≥ 50	-
CM 363	≥ 50	-
CM 364	≥ 50	-

Tabla 4. Actividad citotóxica de los compuestos derivados de quinolinas (CMs). Derivados de quinolinas evaluados sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*, mediante MTT. Compuesto seleccionado para siguiente fase de estudio, CM100. Compuestos con EC₅₀ estimados sobre 50μM, fueron obviados para siguientes fases de estudio.

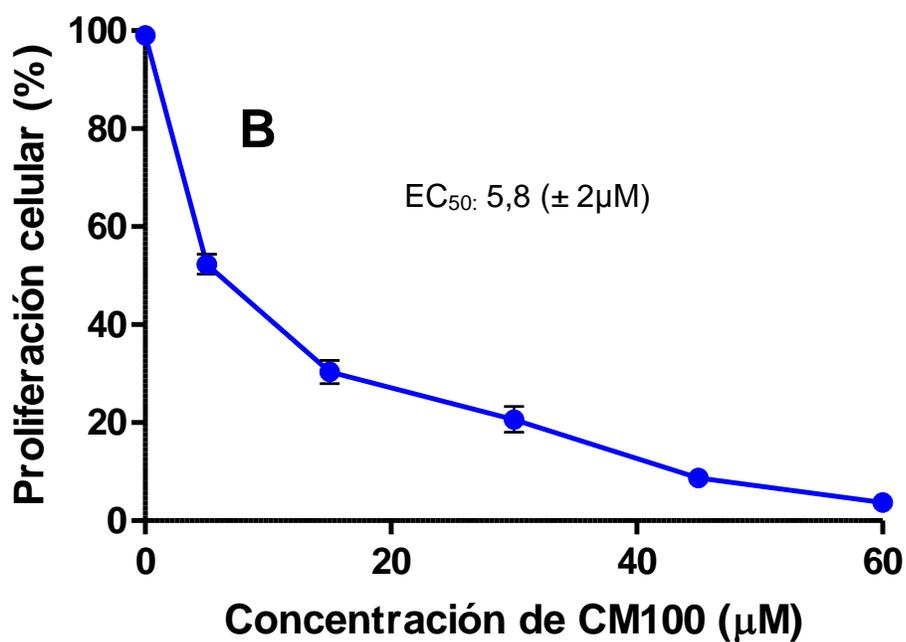
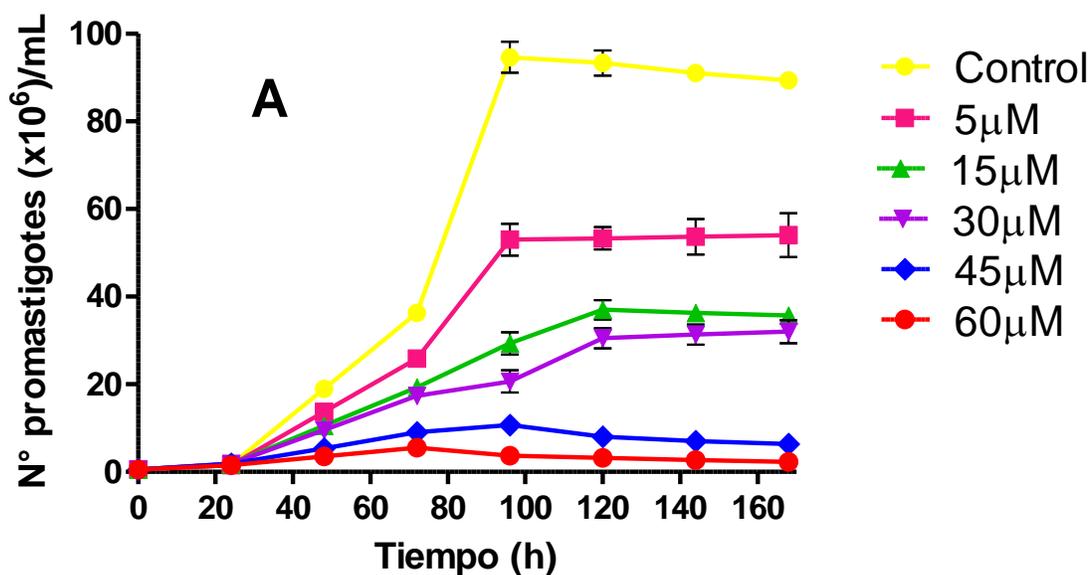


Figura 8: susceptibilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis* a CM100. Poblaciones de promastigotes de *L. braziliensis* fueron expuestas a concentraciones crecientes de CM100. (A) Curva de crecimiento. Cada condición, fue contada en cámara de Neubauer por triplicado. (B). Curva dosis-respuesta. Se realizó una curva dosis-respuesta con los datos de 72h luego de agregada el compuesto. EC₅₀: 5,8 (± 2μM).

I.3.- Determinación del efecto del CM100 sobre el potencial electrogénico mitocondrial en promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

Con la finalidad de observar cual de los organelos intracelulares fué afectado por el compuesto, se cargaron promastigotes de esta especie de parásitos con el fluoróforo específico de mitocondrias Rodamina 123, el cual funciona como un sensor del potencial electroquímico de esta organela. La figura 9A muestra que el CM100 desestabilizó el potencial electrogénico mitocondrial en promastigotes de *Leishmania braziliensis*. Este efecto fue similar al generado por FCCP el cual es un protonóforo clásico, desacoplante de la cadena transportadora de electrones de la fosforilación oxidativa mitocondrial. En la figura 9B, se observa el efecto del FCCP, que es un protonóforo que censa las variaciones del potencial electrogénico, y al agregar el JC25 no se generó ninguna respuesta alterna, a la provocada por el control positivo.

I.4.- Determinación del efecto del CM100 sobre acidocalcisomas en *Leishmania braziliensis*

Con la finalidad de observar el efecto del CM100 sobre el funcionamiento de los acidocalcisomas de *L. braziliensis*, se cargaron promastigotes de esta especie de parásitos con el fluoróforo naranja de acridina. Recordemos, que este fluoróforo tiene la propiedad de acumularse en compartimientos ácidos, de acuerdo con el potencial de H^+ presente en los mismos y que la acumulación de la naranja de acridina en los acidocalcisomas es medida por la extinción de la fluorescencia emitida a 530 nm, debida a la dimerización del compuesto.

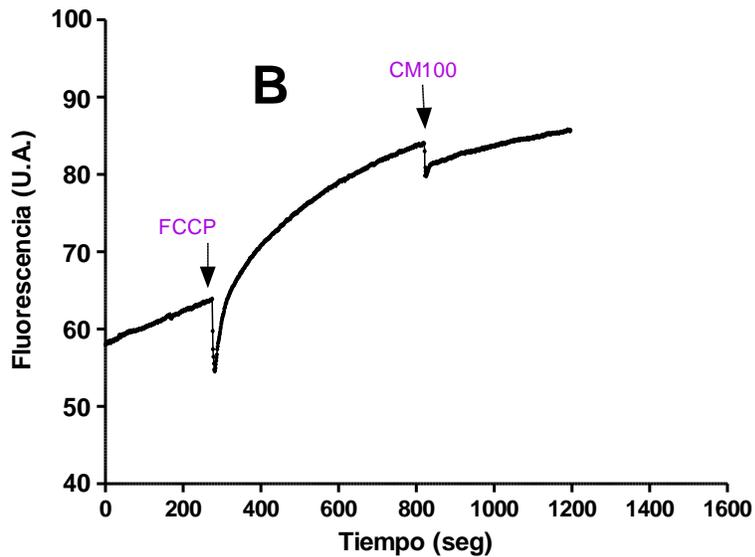
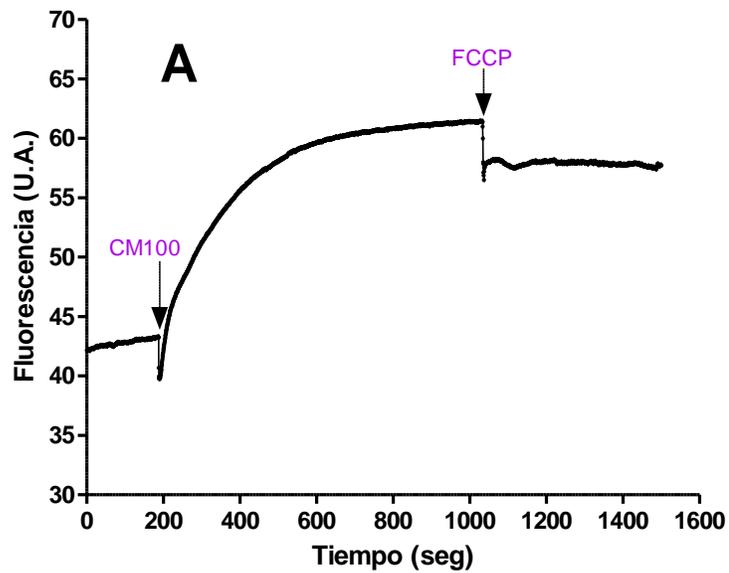


Figura 9: efecto de CM100 sobre el potencial electroquímico de promastigotes de *Leishmania braziliensis*. Parásitos incubados en presencia de Rodamina 123 por 45 min. Células levemente permeabilizadas con digitonina (DIG) 1 μ M. (A) efecto de la adición de CM100 (5,8 μ M)-FCCP (1 μ M) sobre el potencial electroquímico mitocondrial. (B) efecto de la adición de FCCP (1 μ M)-CM100 (5,8 μ M) sobre el potencial electroquímico mitocondrial. Parámetro determinado fluorimétricamente, como se comentó anteriormente.

La figura 10A muestra que el CM100 generó una rápida alcalinización de los acidocalcisomas. Se observa, que la alcalinización generada por el CM100 es completa, debido a que al agregar nigericina, el cual es un intercambiador H^+/K^+ , capaz de alcalinizar estos organelos, no se genera ninguna respuesta adicional. En la figura 10B, se observa el efecto de la nigericina en primera instancia, que alcaliniza completamente los acidocalcisomas, y al agregar el CM100 no se generó ninguna respuesta alterna, corroborándose con esto el comportamiento anterior.

I.5 Determinación del efecto del CM100 sobre la biosíntesis de esteroides libres en promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

Con la finalidad de evaluar el efecto del CM100 sobre la biosíntesis de esteroides libres de *Leishmania braziliensis* (figura 11), las fracciones de lípidos neutros de promastigotes tratados y no tratados con CM100, fueron analizadas en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución. Luego de estudiar estas fracciones en promastigotes no expuestos a la droga (tabla 5), nos fue posible determinar que las cantidades naturales del intermediario escualeno eran de 22,7% y del producto final de esta ruta para *Leishmania braziliensis*, 5-dehidroepisterol, eran de 63,7%. Se pudo determinar que el CM100 5,8 μ M (EC_{50} , determinado en promastigotes en cultivo) generó la acumulación del intermediario escualeno en un 64,3% (tabla 5), en conjunto con una disminución de la producción del producto final 5-dehidroepisterol (25,1%).

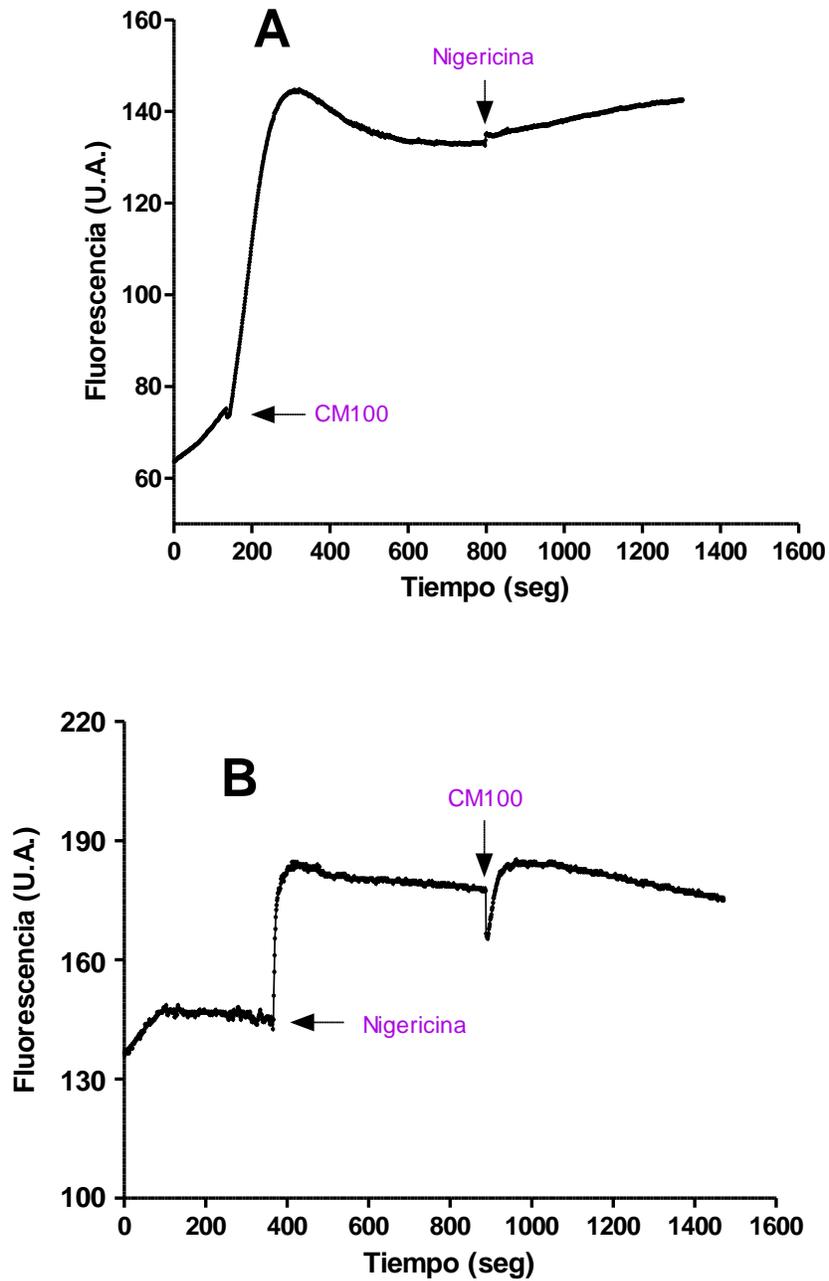


Figura 10: efecto del CM100 sobre la alcalinización de acidocalcisomas en promastigotes de *Leishmania braziliensis*. Parásitos incubados en presencia de Naranja de Acridina por 5 min. (A) efecto de la adición del CM100(5,8 μ M) - nigericina(2 μ M) sobre los niveles ácidos de los acidocalcisomas. (B) efecto de la adición de nigericina(2 μ M) - CM100(5,8 μ M) sobre los niveles ácidos de los acidocalcisomas. Parámetro determinado fluorimétricamente según lo comentado en Materiales y Métodos.

Biosíntesis de esteroides libres en *Leishmania braziliensis*

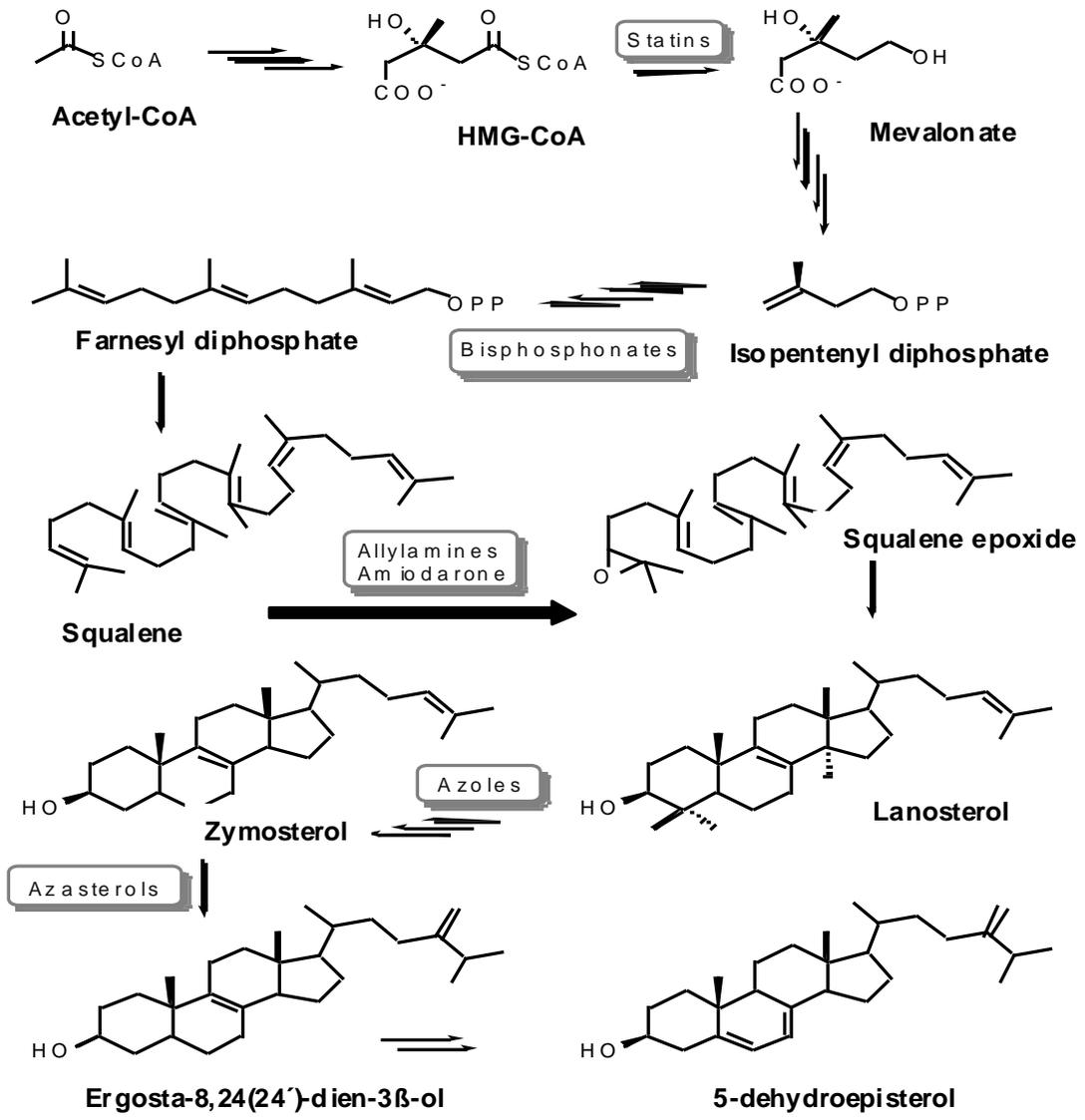


Figura 11: fragmento de la ruta de biosíntesis de esteroides libres en *Leishmania* spp. (Serrano-Martín y col. 2009b).

Esteroles	Tiempo de retención	% de masa luego del tratamiento con:	
		Control	CM100 (5,8µM)
Colesterol exógeno	24,2	13,6	10,6
<u>14-methyl Endógeno</u> Escualeno	20,5	22,7	64,3
<u>14-desmethyl Endógeno</u> Ergosta-5,7,24(24 ¹)-trien- 3β-ol (5-dehidropisterol)	28,9	63,7	25,1

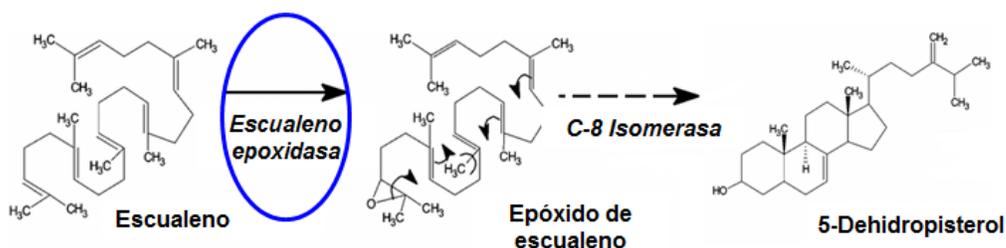


Tabla 5: efecto del CM100 sobre la biosíntesis de esteroides libres en promastigotes de *Leishmania braziliensis*. Porcentajes de masas del intermediario escualeno y 5-dehidropisterol en esta ruta biosintética. Promastigotes control y expuestos a CM100, 5,8µM. Parámetros determinados mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrometría de masas de alta resolución.

I.6.- Determinación del efecto del CM100 sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*.

Con la finalidad de determinar el efecto de este compuesto sobre el estadio quimioterapéuticamente importante de la leishmaniasis (amastigote intracelular), se procedió a infectar macrófagos BMDM con promastigotes de *Leishmania braziliensis* en una proporción de 10 promastigotes por cada macrófago en cultivo, evaluándose el efecto de diversas concentraciones de CM100 sobre: a) porcentaje de macrófagos infectados y b) número de amastigotes por macrófago. Con la construcción de una curva dosis-respuesta, fue posible observar la existencia de un efecto dosis-dependiente sobre el porcentaje de macrófagos infectados y sobre la cantidad de amastigotes por macrófago. Se determinó que la concentración efectiva de CM100 necesaria para eliminar el 50% de los amastigotes intracelulares fue de 20,2 μ M (figura 12). De la misma manera observamos que el CM100 no afecta la viabilidad de los macrófagos en cultivo, siendo el efecto netamente contra los amastigotes.

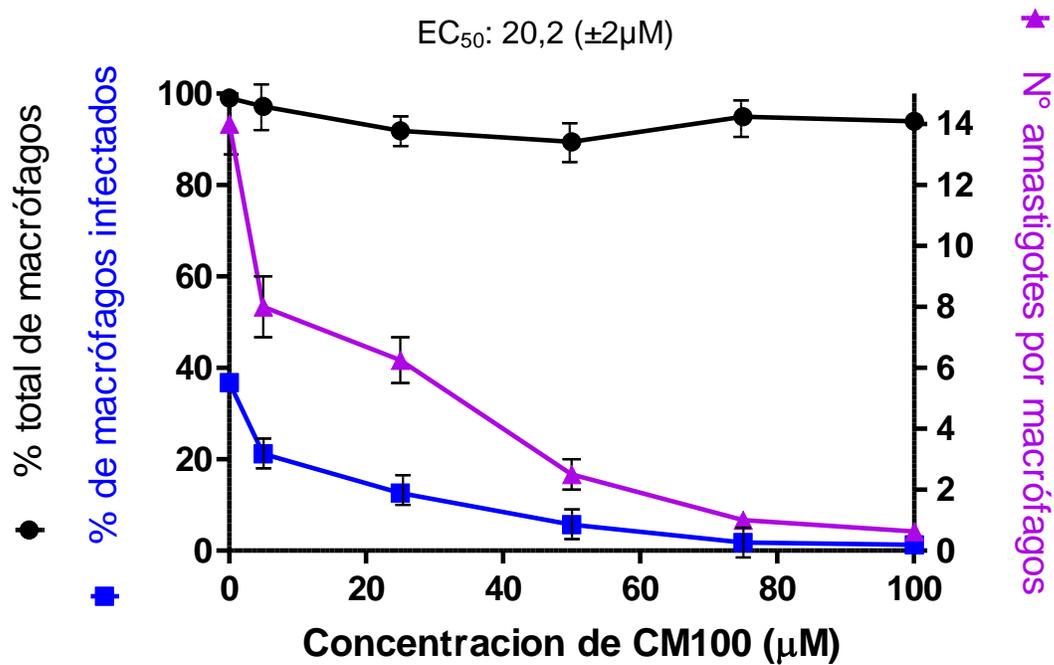


Figura 12: efecto del CM100 sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*. Macrófagos BMDM infectados con amastigotes de *L. braziliensis* en una proporción 1:10. Porcentaje de macrófagos infectados, N° de amastigotes/macrófago y porcentaje total de macrófagos determinados a las 72 horas post-tratamiento. EC₅₀: 20,2 µM. Se realizó un conteo directo a través de la cámara de Neubauer por triplicado.

**Capítulo II: Evaluación del efecto in vitro de JCs
sobre la viabilidad de *Leishmania braziliensis*.**

En la sección anterior demostramos que el CM100: genera un efecto dosis dependiente sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*, afecta la bioenergética parasitaria, perturbando el funcionamiento de mitocondria y acidocalcisomas, y que además, genera la inhibición de la biosíntesis de esteroides libres en promastigotes de esta especie de parásitos, afectando la actividad de la enzima escualeno epoxidasa. Seguidamente, evaluamos el efecto de derivado de benzimidazol, sobre la viabilidad de *L. braziliensis*.

II.1.- Evaluación del efecto de JCs sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*, mediante MTT.

Poblaciones de promastigotes de esta especie de parásitos fueron expuestas a una concentración única de 50µM de cada derivado de benzimidazol, con la finalidad de evaluar la actividad parasiticida, mediante MTT. Los compuestos seleccionados para las siguientes fases fueron aquellos que inhibieron la proliferación celular en un 50% o más, comparado con el control sin droga. Inmediatamente, los compuestos seleccionados fueron evaluados sobre macrófagos BMDM (en concentraciones de 100, 200 y 300µM), con la finalidad de comprobar la inocuidad de los mismos sobre la célula hospedera. El compuesto seleccionado se muestra en la tabla 6. Es importante tener en cuenta, que para fases siguientes, fue seleccionado el derivado JC25 por poseer alta actividad parasitaria, alta inocuidad sobre la célula hospedera y buenas condiciones de solubilidad y estabilidad en el tiempo.

Droga	EC₅₀ <i>L. Braziliensis</i> (μM)	EC₅₀ Macrófagos (μM)
JC15	≤ 50	≥ 100
JC16	≥ 50	-
JC19	≥ 50	-
JC25	≤ 50	≥ 300
JC27	≥ 50	-
JC28	≥ 50	-
JC31	≥ 50	-
JC35	≥ 50	-
JC42	≥ 50	-
JC43	≥ 50	-
JC44	≥ 50	-
JC46	≥ 50	-
JC50	≥ 50	-
JC53	≥ 50	-

Tabla 6. Actividad citotóxica de los compuestos derivados de benzimidazol (JCs). Derivados de benzimidazol evaluados sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*, mediante MTT. Compuesto seleccionado para siguientes fases de estudio, JC25. Compuestos con EC₅₀ estimados sobre 50 μ M, fueron obviados para siguientes fases de estudio.

II.2.- Evaluación de la susceptibilidad a JC25 en promastigotes de *Leishmania braziliensis*, curvas de crecimiento.

Con la finalidad de determinar el efecto del JC25 sobre promastigotes de esta especie de parásitos, fueron expuestos a diversas concentraciones crecientes de JC25, determinándose su viabilidad diariamente durante 5 días y a través de conteo directo con cámara de Neubauer, comparándose con una población de

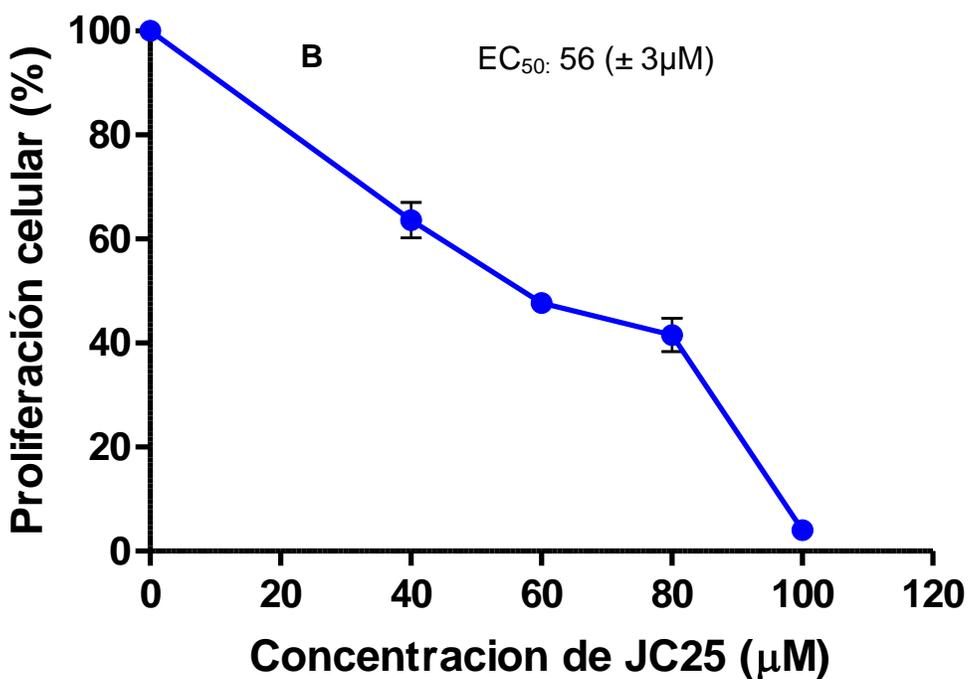
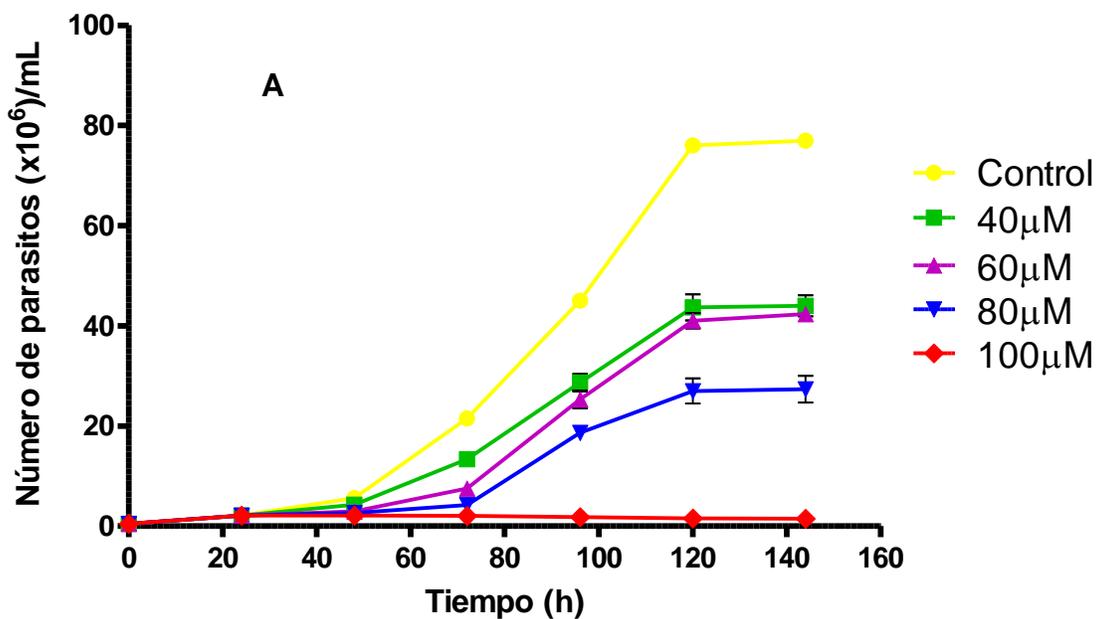


Figura 13: susceptibilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis* a JC25. Poblaciones de promastigotes de *L. braziliensis* fueron expuestas a concentraciones crecientes de JC25. (A) Curva de crecimiento. Cada condición fue contada en cámara de Neubauer por triplicado. (B). Curva dosis-respuesta. Se realizó un a curva dosis-respuesta con los datos de 72h luego de agregado el compuesto. $EC_{50}: 56 (\pm 3 \mu M)$.

parásitos control no expuestos a droga alguna. Los resultados muestran (figura 13A) un efecto dosis dependiente de los parásitos hacia las concentraciones crecientes de JC25. Con los datos de conteo a las 72h de cultivo (fase exponencial), se construyó una curva dosis respuesta. Con la construcción de esta curva, fue posible determinar la concentración de JC25 capaz de inhibir el 50% de la población celular en cultivo (EC_{50}): 56 μ M (figura 13B).

II.3.- Determinación cualitativa del efecto del JC25 sobre el potencial electrogénico mitocondrial y acidocalcisomas en promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

Mediante microscopía de fluorescencia, se evaluó de manera cualitativa el potencial de membrana mitocondrial y la alcalinización de los acidocalcisomas en promastigotes de *Leishmania braziliensis*, expuestos a JC25.

Podemos observar entonces, que el JC25 a una concentración de 56 μ M (figura 14) afectó el potencial electrogénico mitocondrial, de manera similar al efecto generado por FCCP (conocido como un protonóforo desacoplante de la cadena transportadora de electrones de la fosforilación oxidativa mitocondrial en tripanosomatideos).

De igual forma, observamos que el JC25 a una concentración de 56 μ M (figura 15) afectó los niveles de acidez en acidocalcisomas, efecto este, similar al generado por nigericina (intercambiador H^+/K^+ , conocido por generar alcalinización total de acidocalcisomas en tripanosomatideos).

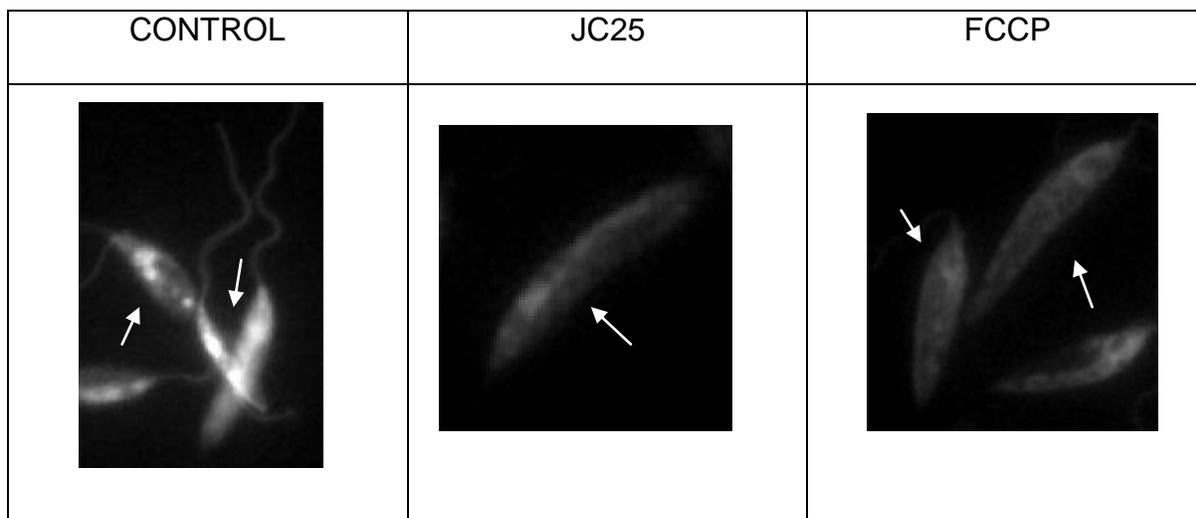


Figura 14. Determinación cualitativa del efecto del JC25 sobre el potencial electrogénico mitocondrial en promastigotes de *Leishmania braziliensis*. Parásitos incubados en presencia de Rodamina 123 por 45 min. CONTROL (parásitos cargados, sin compuesto), JC25 (parásitos cargados + JC25, 56 μ M), FCCP (parásitos cargados + FCCP, 2 μ M).

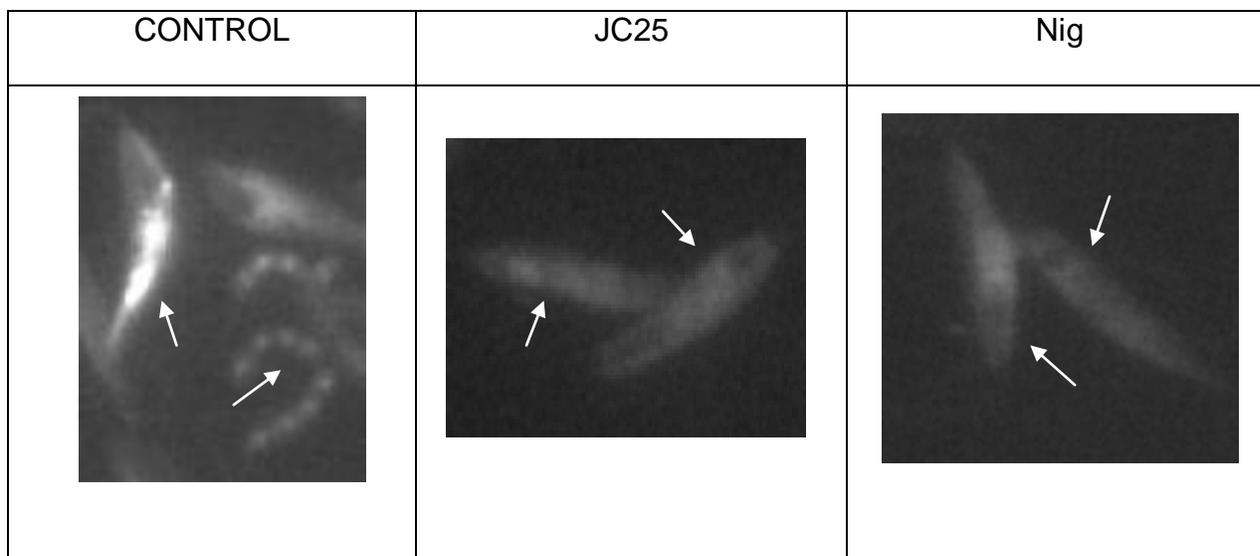


Figura 15. Determinación cualitativa del efecto del JC15 sobre la alcalinización de acidocalcisomas en promastigotes de *Leishmania braziliensis*. Parásitos incubados en presencia de Naranja de Acridina por 5 min. CONTROL (parásitos cargados, sin compuesto), JC25 (parásitos cargados + JC25, 56 μ M), Nigericina (parásitos cargados + Nig, 2 μ M).

Los valores de porcentaje de masas control (promastigotes no expuestos a la droga) para el intermediario escualeno fue 22,7%, mientras que para el 5-dehidroepisterol fue 63,7% (tabla 7). Demostramos entonces que al exponer poblaciones de promastigotes en cultivo a 56 μ M JC25 por 5 días, se generó la acumulación de escualeno en un 73,2% disminuyendo drásticamente el porcentaje de masa del producto final 5-dehidroepisterol 16,2% (tabla 7).

II.5.- Determinación del efecto del JC25 sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*.

Con la finalidad de determinar el efecto de este compuesto sobre el estadio quimioterapéuticamente importante de la leishmaniasis (amastigote intracelular), se procedió a infectar macrófagos de la línea BMDM con promastigotes de *Leishmania braziliensis* en una proporción de 10 promastigotes por macrófago en cultivo, evaluándose el efecto de diversas concentraciones de JC25 sobre: a) porcentaje de macrófagos infectados y b) número de amastigotes por macrófago.

Con la construcción de una curva dosis-respuesta, se determinó que la concentración efectiva de JC25 necesaria para eliminar el 50% de los amastigotes intracelulares fue 12,78 μ M (figura 16). De igual forma, observamos en la figura 16, que el JC25 no afecta la viabilidad de los macrófagos en cultivo, siendo el efecto netamente contra los amastigotes.

Esteroles	Tiempo de retención	% de masa luego del tratamiento con:	
		Control	CM100 (56µM)
Colesterol exógeno	24,2	13,6	10,6
<u>14-methyl Endógeno</u> Escualeno	20,5	22,7	73,2
<u>14-desmethyl Endógeno</u> Ergosta-5,7,24(24 ¹)-trien- 3β-ol (5-dehidroepisterol)	28,9	63,7	16,2

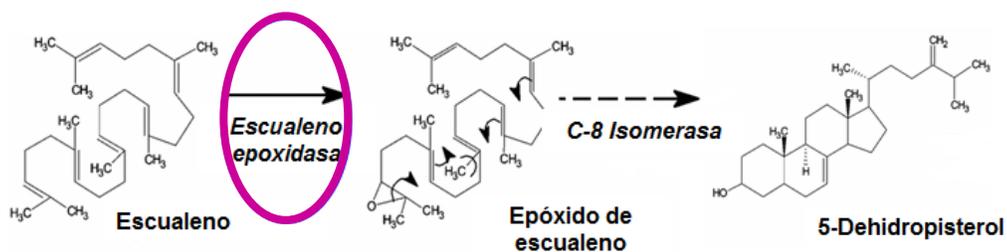


Tabla 7: efecto del JC25 sobre la biosíntesis de esteroides libres en promastigotes de *Leishmania braziliensis*. Porcentajes de masas del intermediario escualeno y 5-dehidroepisterol de esta ruta biosintética. Promastigotes control y expuestos a JC25, 56µM. Parámetros determinados mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrometría de masas de alta resolución.

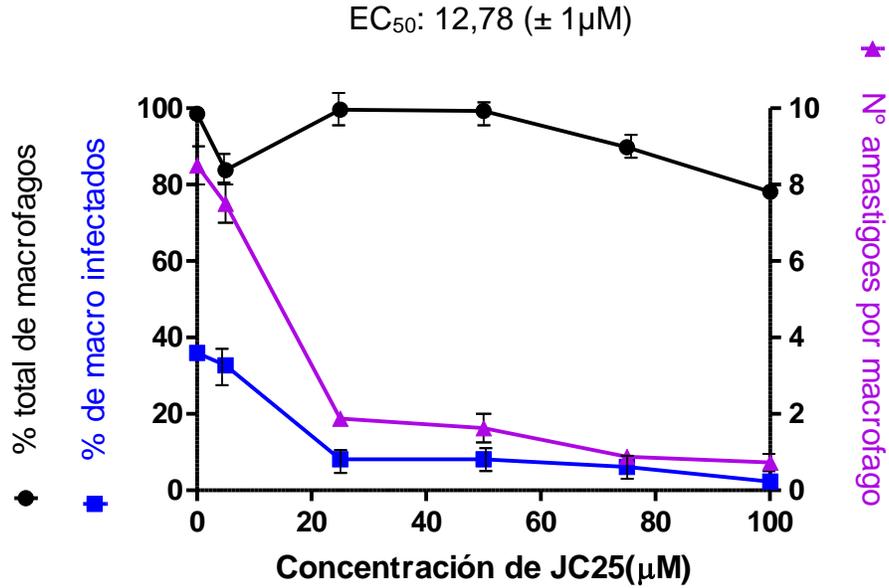


Figura 16: efecto del JC25 sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*. Macrófagos BMDM infectados con amastigotes de *L. braziliensis* en una proporción 1:10. Porcentaje de macrófagos infectados, Nº de amastigotes por macrófago y porcentaje total de macrófagos determinados a las 72 horas post-tratamiento. EC₅₀: 12,78 μM. Se realizó un conteo directo a través de la cámara de Neubauer por triplicado.

DISCUSSION

A pesar de la actual existencia de algunas alternativas y estudios prometedores, el hecho concreto es que, hasta el momento, no existen vacunas efectivas contra la leishmaniasis y el arsenal quimioterapéutico de primera línea utilizado para el tratamiento de esta enfermedad, basado en el uso de antimoniales pentavalentes como el Glucantime y el Pentostan, ha resultado ser realmente insuficiente para el tratamiento de este problema de salud pública. Entre otras desventajas del uso de los antimoniales pentavalentes están: la generación de graves efectos adversos a nivel cardíaco, renal y hepático, su vía de administración parenteral, los largos periodos de tratamiento y el desarrollo de resistencia a los fármacos. Estos argumentos, son evidencia de la inmediata necesidad de adelantar investigaciones, en términos de validar nuevos blancos de drogas en tripanosomatideos como *Leishmania braziliensis*, que permitan ensayar el efecto de compuestos alternativos, económicos y seguros que comprometan de manera directa la viabilidad de este parásito, afectando en el menor grado posible la viabilidad del organismo infectado.

En este sentido, hemos estudiado el efecto *in vitro* de 13 derivados de Quinolinas y 14 derivados de Benzimidazol sobre la viabilidad de *Leishmania braziliensis* y su célula hospedera (macrófagos BMDM). Además investigamos acerca del mecanismo de acción de estos compuestos y su posible relación con la bioenergética celular y la biosíntesis de esteroides en estos parásitos.

En el capítulo I, evaluamos el efecto del derivado de Quinolina CM100, sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*.

Mediante evaluaciones con MTT determinamos que de los 13 derivados de Quinolinas (tabla 4), el compuesto CM100 fue al menos 4 veces más potente sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis* que sobre su célula hospedera (macrófagos BMDM), además de poseer las mejores características de solubilidad y estabilidad en el tiempo. Basados en estas razones, escogimos al CM100 (figura 17) como el derivado Quinolínico a evaluar en siguientes fases de estudios.

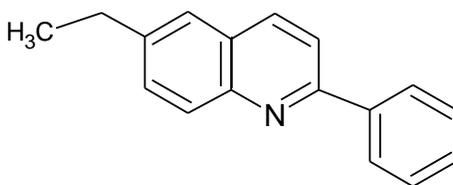


Figura 17. Estructura del derivado de quinolina CM100. Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Colombia; a cargo del Dr. Vladimir Kouznetsov.

De este modo y mediante la construcción de curvas de crecimiento fue posible determinar que el CM100 generó un efecto dosis-dependiente sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*, mostrando un valor de EC_{50} : $5,8\mu\text{M}$ (figura 9). Este comportamiento resultó similar al reportado para el derivado Quinolínico sitamaquina, el cual demostró tener actividad leishmanicida (EC_{50} : $5,7\mu\text{M}$), sobre promastigotes de esta especie de parásitos. (Garnier y col. 2007). Duenas-Romero y col. 2007, proponen que la sitamaquina por ser un compuesto aromático cargado positivamente, interactúa directamente con las cadenas alkil de la membrana fosolípídica de los promastigotes, ingresando al interior de los

mismos y generando el efecto antiparasitario. Lo anterior representaría, una posible explicación del mecanismo mediante el cual el CM100 afecta la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*.

En otro orden de ideas, una de las características representativas del CM100 es la presencia de una sustitución en el carbono 2 de su anillo aromático. Se ha descrito en la bibliografía, que este tipo de sustituciones, son esenciales para la actividad leishmanicida de los derivados quinolínicos (Fakhfakh y col. 2003; Fournet y col. 1996; Fournet y col. 1994). De hecho, Fakhfakh y col. (2003), demuestran que una serie de derivados quinolínicos con sustituciones en el carbono 2, afectaron gravemente la viabilidad de promastigotes de *L. donovani* con un EC₅₀ de 3 µM.

Este estudio representaría una segunda evidencia que sustente, la actividad del derivado de quinolina CM100 sobre promastigotes de *L. braziliensis*.

Teniendo en cuenta que el derivado quinolínico sitamaquina induce un rápido colapso en el potencial de membrana mitocondrial (Vercesi y Docampo. 1992), y una extensiva alcalinización de los acidocalcisomas en promastigotes de *L. donovani* (Vercesi y col. 2000); en el presente estudio evaluamos el efecto del CM100 sobre el funcionamiento de estos dos importantes organelos en *L. braziliensis*.

En este sentido, demostramos que el CM100 afectó gravemente el potencial electrogénico mitocondrial de esta especie de parásitos (figura 10) ya que fue capaz de simular el efecto del protonóforo FCCP, induciendo la liberación

de rodamina 123 desde la membrana interna de la mitocondria, como producto del colapso en el potencial electrogénico de esta organela. Luque-Ortega y col. 2001 reportaron que el derivado de quinolina naftoquinona, genera una alteración en el potencial de membrana mitocondrial en *Leishmania* spp., lo cual se tradujo en un potente efecto sobre la viabilidad de parásitos de este género.

Seguidamente, demostramos que el CM100 es capaz de afectar el normal funcionamiento de otros importantes organelos característicos de tripanosomatídeos, como lo son los acidocalcisomas. Los resultados muestran que el CM100 induce una rápida alcalinización de los acidocalcisomas (figura 11), similar a la generada por nigericina, intercambiador H^+/K^+ electroneutro conocido por su capacidad de alcalinizar los acidocalcisomas de estos parásitos. (Docampo y col. 1995; Docampo y Moreno. 2001). Vercesi y col. 2000, demostraron que la sitamaquina genera una total alcalinización de acidocalcisomas afectando gravemente la viabilidad de promastigotes de *L. tropica*.

No obstante, en nuestro caso la afectación del normal funcionamiento de la mitocondria y acidocalcisomas, como principales fuentes bioenergéticas de estos parásitos, explicarían en parte el potente efecto que tiene el CM100 sobre la viabilidad de *Leishmania braziliensis*.

En términos de seguir sustentando el efecto observado por el CM100 sobre la viabilidad de *L. braziliensis*, indagamos otros posibles mecanismos de acción, los cuales en conjunto, nos permitieran explicar la acción leishmanicida observada.

Nos propusimos entonces, determinar el efecto del CM100 sobre la biosíntesis de esteroides libres de *Leishmania braziliensis*.

En este sentido (tabla 5), determinamos que promastigotes no tratados presentaron niveles de 5-dehidroepisterol del 63,7%, y del intermediario escualeno de 22,7%, los cuales son similares a los reportados anteriormente para este género de parásitos (Rodríguez, C.F. y col. 2002). Interesante fue el hecho que los parásitos expuestos a CM100 mostraron una disminución en los niveles de 5-dehidroepisterol 25,1% y una acumulación de escualeno del 64,3%. Lo anterior sugiere que este compuesto afectó la actividad de la enzima escualeno epoxidasa implicada en la ruta de síntesis de 5-dehidroepisterol en *Leishmania* spp (tabla 5 y figura 12).

Teniendo en cuenta que la escualeno epoxidasa es esencial en la ruta de biosíntesis de 5-dehidroepisterol en *Leishmania* spp. (Urbina y Docampo. 2003), este resultado representa otro argumento que sostiene el potente efecto del CM100 sobre la viabilidad de *Leishmania braziliensis*.

Interesante fue el hecho que el CM100 afectara la viabilidad de amastigotes intracelulares de esta especie de parásitos, el cual, es el estadio clínicamente importante de la leishmaniasis. En este sentido, determinamos que el CM100 afectó la viabilidad de amastigotes intracelulares de manera dosis-dependiente, con un valor de EC_{50} : 20,2 μ M (figura 13), sin afectar la viabilidad de la célula hospedera (macrófagos BMDM). Vennestrom y col. 1990, reportaron actividades similares para el derivado de Quinolina Berberina, el cual afectó la viabilidad de

amastigotes intracelulares de *L. donovani* y *L. panamensis* mostrando valores de EC_{50} : 25 μ M.

Si bien es cierto que la actividad del CM100 sobre amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* es similar a algunas otras reportadas en la literatura y comentadas anteriormente, también es cierto que el CM100 resultó ser menos efectivo sobre este estadio parasitario (EC_{50} : 20,2 μ M) que sobre promastigotes (EC_{50} : 5,8 μ M). Esta clase de fenómeno, es explicado por Tempone y col. 2001, basado en los siguientes argumentos: a) una baja tasa de consumo de compuestos con estructuras quinolónicas por los macrófagos, con una subsecuente baja concentración de compuesto que alcanza a las vacuolas parasitóforas; b) la inactivación de los compuestos Quinolónicos dentro de los macrófagos y/o c) las diferencias metabólicas de los amastigotes, tales como las enzimas del sistema antioxidante, entre otras que podrían inactivar los compuestos. Basados en estas evidencias, sería interesante evaluar el efecto de derivados Quinolónicos con otras sustituciones puntuales, que afecten en mayor grado la viabilidad de amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*.

En el capítulo II de este trabajo evaluamos la actividad leishmanicida de 14 derivados de benzimidazol, sobre promastigotes y amastigotes de *L. braziliensis*.

Se ha reportado que derivados de benzimidazol afectan tanto la viabilidad, como la biosíntesis de esteroides de epimastigotes de *T. cruzi* (Merlino y col. 2012). Sin embargo, no se conoce la relación del efecto de los benzimidazoles sobre la

bioenergética celular y/o la biosíntesis de esteroides sobre el también tripanosomatideo *Leishmania braziliensis*.

En este orden de ideas, evaluamos el efecto del derivado de Benzimidazol JC25, sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*. Similar a lo explicado en la sección anterior, mediante evaluaciones con MTT determinamos que de los 14 derivados de Benzimidazol (tabla 6), el compuesto JC25 fue al menos 6 veces más potente sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis* que sobre su célula hospedera (macrófagos BMDM), además de poseer las mejores características de solubilidad y estabilidad en el tiempo. Basados en estas razones, escogimos al JC25 (figura 18) como el derivado de Benzimidazol a evaluar en siguientes fases de estudios.

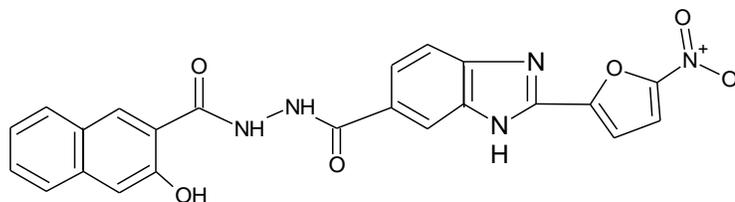


Figura 18. Estructura del derivado de benzimidazol JC25. Laboratorio de Productos Orgánicos, Facultad de Farmacia, UCV Venezuela, a cargo del Dr. Jaime Charris.

Inicialmente, determinamos que el compuesto JC25 generó un efecto dosis-dependiente sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*, mostrando un valor de EC_{50} : 56 μ M (figura 14). Este resultado es similar al reportado por Boiani y col. 2009, los cuales demostraron que el derivado de benzimidazol (2H-

benzimidazole 1,3-dioxide) afectaba la viabilidad de promastigotes *L. braziliensis* con un valor de EC₅₀: 55µM.

Con la finalidad de determinar los posibles mecanismos de acción mediante los cuales el JC25 afectaba la viabilidad de *L. braziliensis*, exploramos el efecto del compuesto sobre la bioenergética celular y la biosíntesis de esteroides de esta especie de parásitos. Teniendo en cuenta que no existe reportes bibliográficos del efecto de derivado de benzimidazol sobre mitocondria y acidocalcisoma de *Leishmania* spp., inicialmente demostramos de manera cualitativa, que el JC25 afectaba el normal funcionamiento de la mitocondria y los acidocalcisomas de *L. braziliensis*, organelos fundamentales en el aporte energético y fisiológico de estos parásitos. En este sentido, el JC25 fue capaz de simular el efecto del protonóforo clásico FCCP, generando un aparente colapso en el potencial electrogénico de esta organela (figura 15). Esta evidencia, concuerda con lo reportado por Vercesi y Docampo. 1992, los cuales demuestran que la diamidina Pentamidina desestabiliza el potencial electrogénico mitocondrial de *L. donovani*, afectando gravemente su viabilidad.

Seguidamente, demostramos de manera cualitativa que el JC25 afectó los niveles normales de acidez de los acidocalcisomas en *L. braziliensis*. Los resultados muestran que el JC25 aparentemente alcaliniza los acidocalcisomas de promastigotes de *L. braziliensis*, efecto similar al generado por Nigericina, intercambiador H⁺/K⁺ electroneutro conocido por su capacidad de alcalinizar los acidocalcisomas de estos parásitos (figura 16). Un comportamiento similar fue

reportado por Serrano-Martín y col. 2009a, los cuales determinaron que el antiaritmico tipo III amiodarona, alcalinizaba los acidocalcisomas de *L. mexicana*, afectando gravemente su viabilidad.

Es importante resaltar que el derivado JC25 presenta una coloración oscura, lo cual dificulta su empleo en evaluaciones fluorimétricas (alta interferencia con la fluorescencia). Por ende, sería interesante para futuros estudios explorar nuevas metodologías, como por ejemplo Citrometría de flujo, de modo tal que sea posible determinar este tipo de efectos de manera cuantitativa.

Sin embargo, en nuestro caso la afectación del funcionamiento normal de la mitocondria y acidocalcisomas, como principales fuentes bioenergéticas de estos parásitos, explicarían en parte el potente efecto que tiene el JC25 sobre la viabilidad de *Leishmania braziliensis*.

Seguidamente, evaluamos otros posibles mecanismos de acción los cuales en conjunto, nos permitieran explicar la acción leishmanicida observada. En este sentido, determinamos que promastigotes no tratados con JC25 presentaron niveles de 5-dehidroepisterol del 63,7%, y del intermediario escualeno de 22,7%, los cuales son similares a los reportados anteriormente para este género de parásitos (Rodríguez y col. 2002). En la tabla 7 es posible observar que los parásitos expuestos a JC25 mostraron una drástica disminución en los niveles de 5-dehidroepisterol 16,2%, así como una acumulación del intermediario escualeno del 73,2%. Lo anterior sugiere que el JC25 afectó la actividad de la enzima escualeno epoxidasa esencial en la ruta de síntesis de 5-dehidroepisterol en

Leishmania spp (tabla 7 y figura 12). Actualmente en la bibliografía, no existe ningún reporte referente al efecto de derivados de Benzimidazoles sobre la ruta de biosíntesis de esteroides en *Leishmania* spp; sin embargo, nuestro grupo de investigación determinó que de manera similar a este estudio, la amiodarona afecta la actividad de la enzima escualeno epoxidasa en promastigotes de *L. mexicana*, traducándose en un potente efecto sobre su viabilidad (Serrano-Martín y col. 2009a).

Considerando que la enzima escualeno epoxidasa es esencial en la ruta de biosíntesis de 5-dehidroepisterol de *Leishmania* spp. (Urbina y Docampo. 2003), la capacidad del JC25 para afectar la actividad de esta enzima podría representar un segundo argumento para explicar su potente efecto sobre la viabilidad de *Leishmania braziliensis*.

Finalmente demostramos que el JC25 afectara notablemente la viabilidad de amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, el cual es el estadio clínicamente importante de la Leishmaniasis. Los resultados muestran que el JC25 fue al menos 4,38 veces más potente sobre este estadio (EC_{50} : 12,78 μ M) que sobre promastigotes libres (EC_{50} : 56 μ M), sin afectar además la viabilidad de su célula hospedera (macrófagos BMDM).

Este potente efecto demostrado sobre amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, resulta importante en términos de adelantar nuevas evaluaciones con modelos biológicos más avanzados para Leishmaniasis como lo son ratones BALb/c infectados (estudios *in vivo*).

En conclusión, el presente trabajo nos permitió demostrar que tanto CM100 como JC25 afectan la viabilidad promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, de manera multifactorial: (1) desestabilizando el potencial electrogénico mitocondrial y alcalinizando acidocalcisomas (bioenergética celular del parásito) y (2) afectando la actividad de la enzima escualeno epoxidasa, generando con esto el bloqueo de la biosíntesis de 5-dehidroepisterol, esencial para la sobrevivencia del parásito.

CONCLUSIONES

Luego de la realización del presente trabajo especial de grado, fue posible llegar a las siguientes conclusiones generales:

1.- El derivado de quinolina CM100 afectó la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis* a un EC_{50} : 5,8 μ M.

2.- CM100 actuó a dos niveles distintos sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*:

- Destabilizó el potencial electrogénico mitocondrial y alcalinizó los acidocalcisomas de dichos parásitos.
- Afectó la actividad de la enzima escualeno epoxidasa esencial en la ruta de síntesis de 5-dehidroepisterol en *Leishmania* spp.

3.- CM100 afectó la viabilidad de amastigotes intracelulares de manera dosis-dependiente, con un valor de EC_{50} : 20,2 μ M, sin afectar la viabilidad de la célula hospedera (macrófagos BMDM).

4.- El derivado de benzimidazol JC25 afectó la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis* a un EC_{50} : 56 μ M.

5.- JC25 actuó a dos niveles distintos sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*:

- Afectó el funcionamiento natural de mitocondria y acidocalcisoma de dichos parásitos.

- Afectó la actividad de la enzima escualeno epoxidasa esencial en la ruta de síntesis de 5-dehidroepisterol en *Leishmania* spp.

6.- JC25 afectó la viabilidad de amastigotes intracelulares de manera dosis-dependiente, con un valor de EC_{50} : 12,78 μ M, sin afectar la viabilidad de la célula hospedera (macrófagos BMDM).

PRODUCTOS OBTENIDOS

1.- Dos (2) Publicaciones enviadas

1.1.- Enviada a **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry.**

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF BENZOTHAZOLE-6-CARBOHYDRAZIDE DERIVATIVES AS ANTIPARASITIC AGENTS

José Camacho,^a Arthur Barazarte,^a Neira Gamboa,^b Juan Rodrigues,^b Hugo Cerecetto,^c Mercedes Gonzáles,^c Jorge Nuñez,^d **Daznia Bompert**,^d Yael García-Marchan,^d Xenón Serrano-Martín,^d Jaime Charris^{a,*}

^{a,-} Laboratorio de Síntesis Orgánica, bUnidad de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Aptdo. 47206, Los Chaguaramos, 1041-A, Caracas, Venezuela. Fax. 582126052707. E-mail: jaimencharris@ucv.ve, ^cDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay. ^dLaboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos. Área de Salud. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Apartado 17606, Caracas 1015-A, Venezuela.

Abstract - A series of N'-substituted-2-(5-nitrofurán or 5-nitrothiophene-2-yl)-3Hbenzo[d]thiazole-6-carbohidrazide derivatives were synthesized and investigated for their abilities to inhibit β -hematin formation, hemoglobin hydrolysis and for their antimalarial efficacy in rodent *Plasmodium berghei*. Moreover, we investigated the effect on the viability of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania braziliensis* *in vitro*. We realized a scan to evaluate cytotoxic effect against two nontumorigenic cell lines. We found that compounds **5a**, **6a**, and **6g** were the most promising as inhibitors of β -hematin formation, however, their effect as inhibitors of hemoglobin hydrolysis *in vitro* and *in vivo* murine studies were marginal. Finally, we demonstrated that the compounds **7f** have a profound effect on the viability of *T. cruzi* (Tulahuen, CL Brener), shown an IC₅₀ values of 7.7 μ M and 0.2 μ M respectively, without affecting the viability of the host cells. All compounds showed a marginal activity against *L. braziliensis*. Compounds **5a** and **7f** showed a good safety index.

Keywords: benzimidazole, malaria, *P. berghei*, Chagas, *T. cruzi*, leishmaniasis, *L. braziliensis*.

1.2.- Enviada a **Acta Científica Venezolana.**

DESARROLLO DE COMPUESTOS ALTERNATIVOS CONTRA LA LEISHMANIASIS DESDE VENEZUELA. EL DERIVADO DE BENZIMIDAZOL JC25, AFECTA GRAVEMENTE LA BIOENERGÉTICA CELULAR Y LA BIOSÍNTESIS DE ESTEROLES DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS.

Jorge Núñez-Durán¹, **Daznia Bompert**¹, Jaime Charris², José Camacho², Daniel Rodríguez³, Tania Rodríguez³, Gonzalo Visba⁴, Álvaro Álvarez⁴, Yael García-Marchan¹ y Xenón Serrano-Martín^{1*}

¹Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos. Área de Salud. Instituto de Estudios Avanzados IDEA. Caracas-Venezuela. ²Laboratorio de Síntesis Orgánica. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela UCV. Caracas-Venezuela. ³Laboratorio de Pesquisa Selectiva. Área de Salud. Instituto de Estudios Avanzados IDEA. Caracas-Venezuela. ⁴Laboratorio de Síntesis Orgánica y Productos Naturales. Centro de Química. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC. Caracas-Venezuela.

Resumen: La Leishmaniasis es considerada por la OMS como 1 de las 6 parasitosis con mayores índices de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Las drogas de primera línea utilizadas (Glucantime y Pentostan) generan graves efectos secundarios en los pacientes tratados. En este sentido, nuestro grupo de investigación se planteó el reto de desarrollar y sintetizar nuevos compuestos antiparasitarios seguros, económicos y efectivos. Bajo metodologías de síntesis rápidas y económicas, logramos obtener 14 compuestos derivados de Benzimidazoles. Con la finalidad de evaluar el potencial antiparasitario, se construyeron curvas de crecimiento evaluando diversas concentraciones de los compuestos. Demostramos que uno de los compuestos (JC25), afectó la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis* en una manera dosis dependiente, con un valor de EC₅₀: 56µM. A través del uso de indicadores fluorescentes, determinamos que este compuesto desestabiliza el potencial electrogénico mitocondrial y genera alcalinización de los acidocalcisomas en estos parásitos. Adicionalmente y a través de estudios de GC/MS, determinamos que el JC25 interfiere con la biosíntesis de esteroides de estos parásitos, afectando la actividad de la enzima escualeno epoxidasa. Estos eventos explicarían en parte, el potente efecto parasiticida observado. Finalmente, el JC25 generó un potente efecto sobre la viabilidad amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* (EC₅₀: 12,78µM), sin afectar la viabilidad de las células hospederas. Teniendo en cuenta que el amastigote intracelular es el estadio terapéuticamente importante de la Leishmaniasis, el efecto mencionado anteriormente resulta muy interesante y permite realizar estudios mas avanzados con este compuesto, o algunos otros con estructuras similares.

Palabras claves: Quimioterapia, *Leishmania braziliensis*, Benzimidazoles, bioenergética celular, esteroides.

2.- Un (2) Trabajo presentado en Congreso Nacional.

DESARROLLO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DEL EFECTO DE COMPUESTOS DERIVADOS DE TETRAHIDROQUINOLINAS SOBRE LA VIABILIDAD DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS. EN LA BÚSQUEDA DE POTENCIALES ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIASIS.

Bompart, D¹, Núñez-Durán, J¹, Rodríguez D¹, Sojo F^{1,2}, Arvelo F^{1,2}, Visbal G³, García-Marchán, Y¹ y Serrano-Martín, X¹

¹ Area de Salud. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Caracas-Venezuela. ² Instituto de Biología Experimental (IBE). Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela. ³ Centro de Química. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas-Venezuela.

Resumen. Desde los años 50's, la terapia con drogas ha sido la alternativa para tratar la Leishmaniasis. El arsenal quimioterapéutico de primera línea para combatir esta enfermedad ha sido: Glucantime y Pentostan. Estos fármacos, producen severos efectos secundarios a saber: dificultades cardíacas, insuficiencia renal y complicaciones hepáticas, entre otros. Por esta razón, actualmente existen muchos grupos de trabajo enfocados en la búsqueda de drogas alternativas que sean seguras, económicas y efectivas en el tratamiento de esta enfermedad parasitaria. Por medio de evaluaciones con MTT y la construcción de curvas de crecimiento, estudiamos el efecto de 14 compuestos de la serie de Tetrahydroquinolinas, sobre la viabilidad de *L. braziliensis in vitro*. El compuesto de esta serie denominado CM100 resultó ser muy efectivo mostrando valores de EC50: 7µM, afectando pobremente la viabilidad de las células hospederas (macrófagos J774-G8). A través de experimentos de fluorescencia con los fluoróforos Rodamina 123 y Naranja de Acridina, demostramos que el mencionado compuesto desestabiliza el potencial electrogénico de la mitocondria y genera la alcalinización de los acidocalisomas en estos parásitos, afectando gravemente su bioenergética celular. Experimentos de cromatografía de gases acoplado a masas, se encuentran actualmente en proceso para determinar el efecto de este compuesto sobre la biosíntesis de esteroides, esencial para estos tripanosomatídeos.

Palabras claves: derivados de Tetrahydroquinolinas, quimioterapia, *Leishmania braziliensis*

SÍNTESIS ORGÁNICA Y BIOLOGÍA: COMPUESTOS ORGÁNICOS DERIVADOS DE BENZOTIAZINAS AFECTAN GRAVEMENTE LA VIABILIDAD DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS Y TRYPANOSOMA CRUZI

Núñez-Durán J¹ **Bompart D**¹; Camacho J², Charris J²; Visbal G³, Rodríguez D¹, García-Marchán Y¹ y Serrano-Martín X¹

¹Area de Salud. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Caracas-Venezuela. ²Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela (UCV).Caracas-Venezuela. ³Centro de Química. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) Caracas-Venezuela.

jnunez@idea.gob.ve; xserrano@idea.gob.ve

La Leishmaniasis y el Mal de Chagas, son enfermedades parasitarias consideradas por la OMS como 2 de las 6 parasitosis con mayores índices de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. A pesar del gran número de esfuerzos enfocados en el desarrollo de vacunas contra estas enfermedades, actualmente la principal alternativa de tratamiento es la quimioterapia. Las drogas comerciales y de primera línea utilizadas (Glucantime y Nifurtimox) son poco efectivas y presentan graves efectos secundarios en los pacientes tratados, lo cual conlleva al abandono prematuro del tratamiento. Por esta razón, en la actualidad nuestro grupo se planteó el reto de desarrollar y

sintetizar nuevos compuestos con actividad antiparasitaria que permitan establecer terapias seguras, efectivas y económicas contra estas enfermedades. En este sentido, hemos sintetizado y evaluado el efecto de 14 compuestos derivados de benzotiazinas, sobre la viabilidad de *L. braziliensis* y *T. cruzi in vitro*. A través de ensayos con MTT y curvas de crecimiento, demostramos que 2 de los compuestos antes mencionados (JC25 y JC16) afectan gravemente la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis* y epimastigotes de *T. cruzi*, mostrando valores de EC₅₀ de 50µM y 0.2µM respectivamente. Cabe destacar que estos derivados afectaron muy levemente la viabilidad de las células hospederas (macrófagos y VERO), presentando a ambos compuestos como alternativas promisorias para futuras evaluaciones. Recientemente, desarrollamos estudios de cromatografía de gases acoplado a masas de alta resolución para determinar si los compuestos mencionados interfieren con la biosíntesis de esteroides de estos parásitos.

Palabras claves: Benzotiazinas, *Leishmania. braziliensis*, *Trypanosoma cruzi*.

3.- Dos (2) Trabajos presentados en Congreso Internacional

XX CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA Y

XV CONGRESO COLOMBIANO DE PARASITOLOGÍA Y MEDICINA TROPICAL

SÍNTESIS ORGÁNICA Y BIOLOGÍA: COMPUESTOS ORGÁNICOS DERIVADOS DE BENZOTIAZINAS AFECTAN GRAVEMENTE LA VIABILIDAD DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS Y TRYPANOSOMA CRUZI

Xenón Serrano-Martín¹, Jorge Núñez-Durán¹, **Daznia Bompert**¹; Jose Camacho²,
Jaime Charris²; Gonzalo Visbal³, Daniel Rodríguez¹ y Yael García-Marchán¹

¹Area de Salud. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Caracas-Venezuela. ²Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela (UCV).Caracas-Venezuela. ³Centro de Química. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) Caracas-Venezuela.

xserrano@idea.gob.ve ; xenonserrano@gmail.com

Introducción: La Leishmaniasis y el Mal de Chagas, son enfermedades parasitarias consideradas por la OMS como 2 de las 6 parasitosis con mayores índices de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Las drogas de primera línea utilizadas (Glucantime y Nifurtimox) son poco efectivas y presentan efectos secundarios en los pacientes tratados. Por esta razón, en la actualidad nuestro grupo se planteó el reto de desarrollar y sintetizar nuevos compuestos con actividad antiparasitaria que permitan establecer terapias seguras, efectivas y económicas contra estas enfermedades.

Materiales y Métodos: Nuestro grupo de trabajo desarrolló y sintetizó 14 compuestos derivados de Benzotiazinas. Con la finalidad de evaluar el potencial antiparasitario, se utilizaron dos técnicas diferentes: en el caso de los parásitos se realizó un escaneo preliminar con MTT para luego

construir curvas de crecimiento parasitario expuestos a diversas concentraciones de los compuestos. Para evaluar el efecto de estos compuestos sobre la viabilidad de células hospederas, utilizamos MTT.

Resultados: Se pudo demostrar que 2 de los compuestos antes mencionados (JC25 y JC16) afectan gravemente la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis* y epimastigotes de *T. cruzi*, mostrando valores de EC_{50} de $50\mu M$ y $0.2\mu M$ respectivamente. Cabe destacar que estos derivados afectaron muy levemente la viabilidad de las células hospederas (macrófagos y VERO). Recientemente, desarrollamos estudios de cromatografía de GC/MS para determinar si los compuestos mencionados interfieren con la biosíntesis de esteroides de estos parásitos, lo cual explicaría en parte el potente efecto parasiticida observado.

Conclusiones: Hemos evaluado 14 compuestos derivados de benzotiazinas, encontrando 2 con alta actividad parasiticida. Para *L. braziliensis*, el JC25 presentó una moderada actividad parasiticida, afectando levemente la viabilidad de su célula huésped. El compuesto perteneciente a esta serie con mayor efectividad resultó ser el JC16, con un EC_{50} de $0,2\mu M$ para *T. cruzi*, siendo prácticamente inocuo para su célula hospedera.

DESARROLLO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DEL EFECTO DE COMPUESTOS DERIVADOS DE (TETRAHIDRO)QUINOLINAS C-2 SUSTITUIDAS SOBRE LA VIABILIDAD DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS, EN LA BÚSQUEDA DE POTENCIAL ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIASIS.

Yael García-Marchán¹, Daznia Bompart¹, Jorge Núñez-Durán¹, Daniel Rodríguez¹, Vladimir V. Kouznetsov², Calos M. Meléndez Gómez,² Felipe Sojo^{1,3}, Francisco Arvelo^{1,3}, Gonzalo Visbal⁴, y Xenón Serrano-Martín¹

¹Area de Salud. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Caracas-Venezuela. ²Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Universidad Industrial de Santander. Colombia. ³Instituto de Biología Experimental (IBE). Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela. ⁴Centro de Química. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas-Venezuela.
ygarcia@idea.gob.ve

Introducción: Desde los años 50's, la terapia con drogas ha sido la alternativa para tratar la Leishmaniasis. El arsenal quimioterapéutico de primera línea para combatir esta enfermedad ha sido: Glucantime y Pentostan. Estos fármacos, producen severos efectos secundarios a saber: dificultades cardíacas, insuficiencia renal y complicaciones hepáticas, entre otros. Por esta razón, actualmente existen muchos grupos de trabajo enfocados en la búsqueda de drogas alternativas que sean seguras, económicas y efectivas en el tratamiento de esta enfermedad parasitaria. **Materiales y Métodos:** Por medio de evaluaciones con MTT y la construcción de curvas de crecimiento, estudiamos el efecto de 14 compuestos de la serie de (tetrahidro)quinolinas C-2 sustituidas, sobre la viabilidad de *L. braziliensis in vitro*. Se estudió el efecto de compuestos seleccionados sobre el potencial mitocondrial, los acidocalcisomas, el contenido de esteroides libres

y la osmoregulación de los promastigotes tratados **Resultados:** De los 14 compuestos evaluados 4 resultaron efectivos contra promastigotes de *L. braziliensis*, siendo relativamente inocuos para su célula hospedera (J774-G8). El compuesto CM100 resultó ser muy efectivo mostrando valores de EC50: 7µM. A través de experimentos de fluorescencia demostramos que el mencionado compuesto desestabiliza el potencial electrogénico de la mitocondria y genera la alcalinización de los acidocalcisomas en estos parásitos, afectando gravemente su bioenergética celular. Experimentos de cromatografía de gases acoplado a masas, se encuentran actualmente en proceso para determinar el efecto de este compuesto sobre la biosíntesis de esteroides, esencial para estos tripanosomatídeos. **Conclusiones:** Compuestos derivados de (tetrahidro)quinolinas C-2 sustituidas presentan un efecto importante sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*, afectando pobremente a la célula hospedera. Al evaluar posibles mecanismos de acción de este efecto, encontramos que altera el correcto funcionamiento de organelos energéticos como la mitocondria y los acidocalcisomas.

BIBLIOGRAFIA

- **Aden, Y.; Gustafsson, L.L.; Ericsson, O. and Hellgren, U. (Eds.). 1995.** Handbook of Drugs for Tropical Parasitic Infections. 2^a ed. Taylor & Francis, Londres.
- **Altés, J.; Salas, A.; Riera, M.; Udina, M.; Galmés, A. and Balanzat, J. 1991.** Visceral leishmaniasis: Another HIV-associated opportunistic infection? Report of eight cases and review of the literature. *AIDS*; 5: 201-7.
- **Alvar J. 1997.** La leishmaniasis: de la Biología al control. Junta de Castilla y León. Madrid. 119-38.
- **Basselín, M. , Coombs, G.H. and Barrett, M.P. (2000).** Putrescine and spermidine transport in Leishmania. *Mol. Biochem. Parasitol.* 109: 37-46.
- **Berman J.D. 1989.** Biochemistry of pentostan resistant. *Am. J. Med. Hygiene.* 40:159-64.
- **Berman, J.D. 1988.** Chemotherapy for leishmaniasis: Biochemical mechanism, clinical efficacy and future strategies. *Rev Infect Dis*; 10: 560-86.
- **Berridge M.V. and Tan A.S. 1993.** Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archiv. of Biochem. and Bioph.* 303: 474-82.
- **Bofante R. y Barroeta S. 2002.** Leishmanias y Leishmaniasis en America con especial referencia a Venezuela. Tipografía y Litografía Horizonte C.A., Primera Edición, Barquisimeto, Venezuela.
- **Boiani, M. and González, M. 2005.** Imidazole and benzimidazole derivatives as chemotherapeutic agents. *Mini-Rev. Med. Chem,* 5:409-24.
- **Boiani, M.; Boiani, L.; Merlino, A.; Hernández, P.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J.J.; Cerecetto, H.; and González, M. 2009.** Second generation of 2H-benzimidazol 1,3-dióxido derivates as anti-trypanisomatid agents: synthesis, biological evaluation, and mode of action studies. *Eur.J.Med.Chem.* 44(11):4426-33.
- **Brito S., Crescente O., Fernández A., Coronado A. and Rodríguez N. 2006.** Eficacia del ácido kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asteracea) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Biomédica.* 26:180-87.
- **Camacho J., Barazarte A., Gamboa N., Rodríguez J., Rojas R., Vaisberg A., Gilman R. and Charris J. 2011.** Synthesis and biological evaluation of benzimidazole-5-carbohidrazide derivaties as antimalarial, cytotoxic and antitubercular agents. *Bioorg. & Med. Chem.* 19:2023-29.

- **Croft S. and Engel J. 2006.** Miltefosine- discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100:S4-8.
- **Davies C., Kaye P., Croft S. and Sundar S. 2005.** Leishmaniasis: new approaches to disease control. *Brit. Med. J.* 326:377-82.
- **Davis A. and Kedziercki L. 2005.** Recent advances in antileishmanial drug development. *Curr. Opin. Invest. Drug.* 6:163-69.
- **De Lima H., Borges R., Escobar J., and Convit J. 2011.** Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela, bienio 2008-2009. *Boletín de malariología y salud ambiental* Vol. LI, N° 2. 215-24.
- **Desjeux P. (2004).** Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Microbiol. Infect. Dis.* 27: 305-18.
- **Díaz C. 1960.** Parasitología Venezolana. Vol. 1. Monografía N° 6. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Fundación La Salle de Ciencias Naturales. Editorial Sucre – Caracas.
- **Docampo R., Scott D., Vercesi A. and Moreno S.N.J. (1995).** Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem.* 310: 1005- 12.
- **Docampo, R. and Moreno, S.N. (2001).** The acidocalcisome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114:151-59.
- **Duenas-Romero, A.M., Loiseau, P.M., and Saint-Pierre-Chazalet, M. 2007.** Interaction of sitamaquine with membrane lipids of *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1768:246-52.
- **Fakhfakh, M., Fournet, A., Prina, E., Mouscadet, J.F., Franck, X., Hocquemiller, R., and Figadère, B. 2003.** Synthesis and biological evaluation of substituted quinolones: potential treatment of protozoal and retroviral coinfections. *Bioorg. Med. Chem.* 11:5013-23.
- **Fasel N. and Myler P. 2008.** Leishmania: After the Genome. Horizon Scientific Press. Edición Ilustrada. Norfolk, UK.
- **Fournet, A., Ferreira, M.E., Torres de Ortiz, S., Fuentes, S., Nakayama, H., Rojas de Arias, A., Schinini, A., and Hocquemiller, R. 1996.** In vivo efficacy of 2-substituted quinolines in experimental treatment of New World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 40:2447-51.
- **Fournet, A., Gantier, J.C., Gautheret, A., Leysalles, L., Munos, M.H., Mayrargue, J., Moskowitz, H., Cavé, A., and Hocquemiller, R. 1994.** The

activity of 2-substituted quinolone alkaloids in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* 33:537-44.

- **Garnier T., Mantyla A., Jarvinen T., Lawrence J., Brown M. and Croft S. (2007).** *In vivo* studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 60:802-810.
- **Ghalib H. and Modabber F. 2007.** Consultation meeting on the development of therapeutic vaccines for past Kala azar dermal leishmaniasis. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 6:3-7.
- **Gil, E.S.; Cunha, L.C. and Gonçalves, A.L.S. 2007.** Importancia de los Compuestos Inorgánicos en el Tratamiento de la Leishmaniasis. *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (3): 454-61.
- **Grogl, M.; Thomason, T.N. and Franke, D.E. 1992.** Drug resistance in leishmaniasis: Its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg*; 47: 117-126.
- **Hernández, L.; Hernández, A.; Castillo, R.; Navarrete, G.; Soria, O.; Hernández, M.; and Yépez, L. 2010.** Synthesis and biological activity of 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazole derivatives against some protozoa and *Trichinella spiralis*. *Eur.J.Med.Chem.* 45(7):3135-41.
- **Huber W. and Koella J. 1993.** A comparison of three methods of estimating EC₅₀ in studies of drugs resistance in malaria parasites. *Acta Trop.* 55:257-61.
- **Korolkovas, A. y Burckhalter, J.H. 1979.** Compendio esencial de Química Farmacéutica. Ed. Reverté, Barcelona. 469-553.
- **Kramp, K.L.; Dewitt, K.; Flora, J.W.; Muddiman, D.C., Slunt, K.M. and Houston, T.A. (2005).** *Tetrah. Lett.* 46: 695-8.
- **Laison, R. y Shaw, L. (1987).** Evolution, classification and geographical distribution. En: *The Leishmaniasis in biology and Medicines*. Peters, W., Killick-Kendrick, R. (Eds). Biology and epidemiology. *Academic Press.* 1:1-120.
- **Leiby D., Kanesa-Thanan N., Scott P., Nancy C. 1994.** Parasitic infections and the Immune System .Leishmaniasis. Págs. 87-117 en: Kierszenbaum, F. (ed). *Ac. Press, San Diego, California.*
- **Lira R., Contreras L.M., Santa-Rita R. and Urbina J.A. (2001).** Mechanism of action of antiproliferative alkyl-lysophospholipids against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. Potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 537-46.

- **Lira. R., Sundar A., KenneyA., Saraiva E. and Sacks D. 1999.** Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian Kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. J. Infect. Dis. 180:564-67.
- **López R. 2000.** Anfotericina B: Determinación en diversos fluidos biológicos por cromatografía líquida. Aplicación a estudios farmacéuticos y de estabilidad química. Tesis Doctoral. Hospital General Vall d'Hebron. Barcelona. España.
- **Luque-Ortega, J.R., Rivero-Lezcano, O.M., Croft, S.L., and Rivas, L. 2001.** *In vivo* monitoring of intracellular ATP levels in *Leishmania donovani* promastigotes as a rapid method to screen drugs targeting bioenergetic metabolism. Antimicrob. Agents Chemother. 45:1121-25.
- **Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D.T. and Opperdoes, F.R. (2000).** Ether-lipid (alkyl-phospholipids analog) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogs in *Leishmania*. Mol. Biochem. Parasitol. 111: 1-14.
- **Machado P., Ampuero J., Guimaraes L., Villasboas L., Rocha A., Schriefer A., Sousa R., Talhari A., Penna G. and Carvalho E. 2010.** Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A Randomized and Controlled Trial. Plos. Negl. Trop. Dis. 4(12):e912.
- **Marecki, P. y Bambury, R. 1984.** Synthesis of 4-sustituid aminoquinoline-3-carboxilates as potencial antimicrobial agents. J.Pharm.Sciences, 73(8), 1141-3.
- **Marim, F., Silveira T., Lima D., and Zamboni D. 2010.** A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. PLoS One. 5(12): 15263-68.
- **Marsden P. 1986.** Mucosal Leishmaniasis. ("escondia" Escomel, 1911). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80(6):859-76.
- **Martinez-Martinez A. 2005.** Quinonas y compuestos relacionados. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín. 1-15.
- **Mella S., Sepúlveda M., González G., Bello H., Domínguez M., Zemelman R. y Ramírez C. 2004.** Aminoglucósidos-aminociclítoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. Rev. Chil. Infect; 21 (4): 330-338.

- **Mendoza-León A., Shaw J., Tapia F. 1996.** A guide for the Cutaneous Leishmaniasis Connoisseur. Molecular and Immune mechanisms in the pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. F.J. Tapia., G. Cáceres-Dittmar & M.A. Sanchez (ed.). Intelligence Unit Series. R.G Landes Bioscience Publishers. 1-23.
- **Merlino, A., Benitez, D., Campillo, N.E., Páez, J.A., Tinoco, L.W., González, M., and Cerecetto, H. 2012.** Amidines bearing benzofuroxan or benzimidazole 1,3-dioxide core scaffolds as *Trypanosoma cruzi*-inhibitors: structural basis for their interactions with cruzipain. *Med. Chem. Commun.* 3-90.
- **Meyerhoff A. (1999).** U.S food and drug administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. *Cin. Infect. Dis.* 28: 49-51.
- **Molyneux W. and Killick-Kendrick R. (1987).** Leishmaniasis in Biology and Medicine. *Academic Press.* 4:794-845.
- **Moore, H.W. and Czerniak, R. 1981.** Naturally occurring quinones as potential bioreductive alkylating agents. *Med. Res. Rev.* 1(3), 249-280.
- **Ouellette M. and Borst P. (1995).** New mechanism of drug resistance in parasitic protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.* 49:427-70.
- **Pal S., Ravindran R. and Ali N. (2004).** Combination therapy using sodium antimony gluconate in stearylamine-bearing liposomes against established and chronic *Leishmania donovani* infection in BALB/c mice. *Antiv. Chem. Chemother.* 48: 3591–3.
- **Pandey S., Suryawanshi S., Gupta S. and Srivastava L. (2005).** Chemotherapy of leishmaniasis part II: synthesis and bio-evaluation of substituted arylketene dithioacetals as antileishmanial agents. *Eur. J. Med. Chem.* 40: 751–6.
- **Pérez-Villanueva, J.; Santos, R.; Hernández-Campo, A.; Giulianotti, M. A.; Castillo, R.; Medina-Franco, J. L. 2010.** Towards a systematic characterization of the antiprotozoal activity landscape of benzimidazole derivatives. *Bioorg Med Chem.* 18(21):7380-91.
- **Peters W. and Killick-Kendrick R., 1987.** The Leishmaniases in Biology and Medicine. Vol. 1. Biology and Epidemiology, Ac. Press. Londres – Inglaterra.
- **Petit C., Yardley V., Gaboriau F., Bolard J. and Croft S.L. (1999).** Activity of heat-induced reformulation of amphotericin B deoxicholate (Fungizone) against *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 390-2.

- **Ponte-Sucre A. and Mendoza-León A. 2001.** Experimental leishmaniasis: synergistic effect of ion channel blockers and interferon- γ on the clearance of *Leishmania major*. *Parasitol. Res.* 87:27-31.
- **Rodrigues C.F., Attias M., Rodriguez C., Urbina J.A. and de Souza W. (2002).** Ultra structural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a 24(25)-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 487–99.
- **Rodríguez R. 1994.** Síntesis de Quinolinas como posible actividad antiparasitaria. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- **Serrano-Martin X., Gracia-Marchan Y., Fernandez A., Rodriguez N., Rojas H., Visbal G. and Benaim G. 2009a.** Amiodarone destabilizes the intracellular Ca^{2+} homeostasis and the biosíntesis of sterols in *Leishmania Mexicana*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:1403-10.
- **Serrano-Martin X., Payares G. and Mendoza-León A. 2006.** Glibenclamide. A blocker of K^{+}_{ATP} channels shows anti-leishmanial activity in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4:72-76.
- **Serrano-Martin X., Payares G., Lucca M., Martinez J., Mendoza-León A. and Benaim G. 2009b.** Amiodarone and Miltefosina Act Synergistically against *Leishmania Mexicana* and can Induce Parasitological Cure in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:5108-13.
- **Sundar S., Agrawald G., Rai M., Makharra M. and Murray H. 2001.** Treatment of Indian visceral leishmaniasis with single or daily infusions of low dose liposomal anfotericin B: randomized trials. *Brit. Med. J.* 323:419-22.
- **Tempone, A.G., Andrade, Jr. H.F., Spencer, P.J., Lourenço, C.O., Rogero, J.R., and Nascimento, N. 2001.** Bothrops moojeni venom kills *Leishmania* spp. With hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26:620-4.
- **Thakur C.P. 1999.** Amphotericin B deoxylate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administrations and precautions: a study of 938 cases. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93:319-23.
- **Torres, H.; Hernández, E.; León, I.; Guerrero, J.; Cedillo, R.; Moo-Puc, R.; Argotte, R.; Rodríguez Mdel C.; Chan-Bacab, M.J.; and Navarrete, G. 2008.** Desing, synthesis and *in vitro* antiprotozoal activity of

benzimidazoles-pentamidine hybrids. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 18(11):3147-51.

- **Urbina J.A. and Docampo R. (2003).** Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 19: 495-501.
- **Vennerstrom, J.L., Lovelace, J.K., Waits, V.B., Hanson, W.L., and Klayman, D.L. 1990.** Berberine derivatives as antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:918-21.
- **Vercesi, A.E., and Docampo, R. 1992.** Ca²⁺ transport digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *Biochem. J.*, 284:463-7.
- **Vercesi, A.E., Rodrigues, C.O., Catisti, R., and Docampo, R. 2000.** Presence of a Na(+)/H(+) exchanger in acidoclastosomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. *FEBS Lett.*, 473:203-6.
- **Welsch, M. E.; Snyder, S. A.; Stockwell, B. R. 2010.** Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14(3):347-61
- **Zuckermam W and Lainson M. (1987).** Evolution, classification and geographical distribution of leishmaniasis in biology and medicine. *Biol. Epidemiol.* 1:22-48.

Vínculos

- www.dpd.cdc.gov/dpdx
- http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html
- www.oms.com