



Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

**EVALUACIÓN DEL EFECTO EN
DERIVADOS DE PIRIDINILQUINOLINAS
SUSTITUIDAS C6-C4, SOBRE LA
VIABILIDAD DE *Leishmania braziliensis*.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela
por el bachiller **Luis Ernesto Piña
Jones** como requisito parcial para
optar al título de Licenciado en
Biología

Tutores: Dr. Xenon Serrano-Martin.
Dra. Valentina Salas.

CARACAS, REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA

FEBRERO, 2018

Acta del Examen Público y Solemne del Trabajo Especial de Grado del

Br. Luis Ernesto Piña Jones

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias y la ilustre Universidad Central de Venezuela, damos fe que examinamos el Trabajo Especial de Grado del Bachiller Luis Ernesto Piña Jones, C.I. 15.801.346 titulado "Evaluación del Efecto en Derivados de Piridilquinolinas C6-C4 Sustituidas, sobre la Viabilidad de *Leishmania braziliensis*", el cual es requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología, mención Biología Celular. Culminada la evaluación, consideramos que dicho trabajo cumple con los requerimientos exigidos en los reglamentos respectivos, por lo cual ha sido **APROBADO**, y calificado con la puntuación de **20 puntos**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 19 días del mes de Febrero del año 2018.



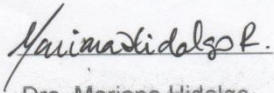
Dr. Xenón Serrano-Martín

Tutor



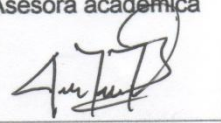
Dra. Valentina Salas

Asesora académica



Dra. Mariana Hidalgo

Jurado



Dr. Francisco Arvelo

Jurado

Resumen

La Leishmaniasis es una enfermedad parasitaria generada por algunas especies patógenas del género *Leishmania* spp. Según la OMS, es considerada como una de las seis parasitosis con mayores índices de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. El tratamiento de primera línea utilizado es la quimioterapia. Las drogas consideradas como de primera línea para el tratamiento de la enfermedad, son los antimoniales pentavalentes Glucantime® y Pentostan®. De ambos compuestos, se conocen sus graves efectos tóxicos a nivel cardíaco, renal y hepático. En este orden de ideas, hemos detectado en la literatura actual, el potente efecto anticancerígeno de derivados de quinolinas y piridinas. Compuestos de esta naturaleza han generado antecedentes atractivos, ya que han demostrado poseer una amplia gama de propiedades biológicas y bioquímicas a través de la combinación de estos dos andamios en una sola molécula (C-6, 4-metil-2-(2-, 3- y 4-piridinil)quinolina. En búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas nos proponemos evaluar el efecto biológico sobre *Leishmania braziliensis*, de 11 nuevos compuestos derivados de Piridinilquinolinas. Inicialmente evaluaremos el efecto de los derivados, sobre la viabilidad de promastigotes de y macrófagos BMDM, mediante MTT y curvas de crecimiento parasitario. En este sentido y con la finalidad de explicar parcialmente el presunto potencial antiparasitario, evaluaremos el efecto de estos derivados, sobre la osmorregulación intracelular de *L. braziliensis*. Finalmente, pretendemos evaluar el efecto de los compuestos seleccionados, sobre amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, el cual representa el estadio terapéuticamente relevante para la enfermedad.

Palabras Clave: *Leishmania braziliensis*, Leishmania cutánea, Piridinilquinolinas, Quimioterapia.

Índice de Contenido

Introducción	1
Leishmaniasis y su agente causal.....	1
Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	2
Manifestaciones clínicas de la Leishmaniasis.....	4
Epidemiología de la Leishmaniasis.....	5
Terapias actuales contra la Leishmaniasis.....	7
Investigaciones y estudios actuales.....	11
Antecedentes	12
Objetivos	18
Objetivos Generales.....	18
Objetivos Específicos.....	18
Materiales y Métodos	19
Materiales-Reactivos.....	19
Derivados de Piridinilquinolinas.....	19
Parásitos y material biológico.....	21
Cultivo celular.....	21
Métodos.....	22
Evaluación preliminar del efecto de compuestos derivados de Piridinilquinolinas sobre la viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> y de células BMDM: MTT.....	22
Evaluación del efecto de compuestos derivados de Piridinilquinolinas, sobre la viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> : curva de crecimiento, dosis-respuesta y cálculo de EC ₅₀	23
Determinación del efecto de compuestos derivados de Piridinilquinolinas, sobre la osmorregulación intracelular en <i>Leishmania braziliensis</i>	26

Evaluación del efecto de compuestos derivados de Piridinilquinolinas, sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de <i>Leishmania braziliensis</i>	26
Resultados	30
Evaluación preliminar del efecto de compuestos de Piridinilquinolinas (MR) sobre la viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> , mediante MTT.....	32
Determinación del efecto del compuesto MR26 sobre la proliferación de células hospederas BMDM.....	32
Evaluación del efecto del compuestos MR26, sobre la viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> : curva de crecimiento, dosis-respuesta y cálculo de EC ₅₀	33
Determinación del efecto de compuestos derivados de Piridinilquinolinas, sobre la osmorregulación intracelular en <i>Leishmania braziliensis</i>	34
Determinación del efecto del MR26 sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares e <i>Leishmania braziliensis</i>	36
Discusión	38
Conclusiones	46
Recomendaciones	46
Bibliografía	47

Índice de Figuras.

Figura 1. Ilustraciones de morfotipos de <i>Leishmania spp.</i>	3
Figura 2. Ciclo biológico del parásito <i>Leishmania spp.</i>	4
Figura 3. Medicamentos utilizados en el tratamiento de la Leishmaniasis.....	8
Figura 4: Estructura química de la Miltefosina.....	10
Figura5: Derivados Piridinilquinolinas evaluados sobre la viabilidad de promastigotes de <i>L. braziliensis</i> , mediante en ensayo MTT.....	31
Figura 6: Derivado seleccionado para próximas fases de estudio: MR26. Estructura del derivado de Piridinilquinolinas MR26 (6-Cloro-4-Metil-2-(3-piridinil)quinolina) para la realización de pruebas biológicas leishmanicida.....	31
Figura 7: Proliferación celular de células hospederas (macrófagos BMDM) sometidas a distintas concentraciones del derivados MR26.....	32
Figura 8: Susceptibilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> a MR26.....	33 y 34
Figura 9: Regulación del volumen celular de promastigotes de <i>L. braziliensis</i>	35
Figura 10: Fotografías que evidencian el proceso de infección de macrófagos BMDM con promastigotes de <i>L. braziliensis</i> en proporción 1:10.....	36
Figura 11: Efecto del MR.26 sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de <i>Leishmania braziliensis</i>	37

Índice de Tablas.

Tabla 1. Derivados de Piridinilquinolinas evaluados contra <i>Leishmania braziliensis</i>	19 y 20
Tabla 2. Filogenia del parásito utilizado en este estudio.....	21
Tabla 3. Porcentaje de proliferación celular de promastigotes de <i>L. braziliensis</i> sometidos a compuestos de Piridinilquinolinas.....	30

Abreviaturas

BMDM.....	Macrófagos derivados de medula ósea.
cAMP.....	Adenosín monofosfato cíclico.
CVC.....	Complejo vacuola contráctil.
DMEM.....	Medio nutritivo.
DMSO.....	Dimetil sulfoxido.
DRV.....	disminución del volumen regulador.
EC ₅₀	Concentración efectiva que inhibe el 50 % de la población.
ED ₅₀	Dosis media eficiente.
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50 % de la población.
K ⁺	Ion potasio.
KCl.....	Cloruro de potasio.
LC.....	Leishmaniasis cutanea.
LIT.....	Medio de cultivo parasitario.
LM.....	Leishmaniasis mucocutanea.
LV.....	Leishmaniasis visceral.
MCF7.....	Células de cáncer de mama.
MRs.....	Derivados de piridinilquinolinas.
MTT.....	Enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa.
mOsM.....	Mili osmolaridad.
MPC.....	Miltesofina.
Na ⁺	Ion Sodio.
PBS.....	Solución Buffer de Fosfato.
ROS.....	Especies reactivas de oxígeno.
RVD.....	Disminución del volumen regulatorio.
RVI.....	Incremento del volumen regulatorio.
SFB.....	Suero Fetal Bovino.

μMMicro Molar.

% M ϕ s.....Porcentaje macrófagos infectados.

Introducción

Leishmaniasis y su agente causal

La Leishmaniasis es una enfermedad metaxénica parasitaria que afecta aproximadamente a 12 millones de personas en el mundo, y que se manifiesta con formas clínicas variadas tales como: cutáneas, mucosas y viscerales. Se ha estimado un total de 1.2 millones de casos por año para las formas cutáneas de la enfermedad, siendo Afganistán, Argelia, Irán, Etiopía, Siria, Brasil, Colombia, Costa Rica y Perú los países que reportan cerca del 75 % de la incidencia global. Esta forma clínica, es considerada como la segunda endemia de tipo tropical y la tercera causa de morbilidad por enfermedades transmisibles, luego de la malaria y la tuberculosis (Calvay-Sánchez y col, 2015). Es causada por organismos del género *Leishmania spp.*, el cual es un parásito protozoario, perteneciente a la familia Trypanozomatidae, orden Kinetoplastida, que engloba a un heterogéneo grupo de protozoos con un tamaño entre 5-89 μm . Los mismos, poseen uno o dos flagelos en algún estado de su ciclo de vida y se caracterizan por tener una mitocondria única, que contiene grandes cantidades de DNA empaquetado en un orgánulo denominado kinetoplasto (Calvay-Sánchez y col, 2015).

El género *Leishmania spp.* incluye 30 especies, de las que aproximadamente 20 son capaces de infectar humanos mediante la picadura de un insecto de la familia Phlebotomus. Las diferentes especies son morfológicamente muy similares, pero se diferencian en su composición de isoenzimas, antígenos, patología y sensibilidad a fármacos (Pérez, 2013)

Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

La morfología de *Leishmania* está determinada por un ciclo de vida complejo, en el que los parásitos están expuestos a diferentes ambientes. Estos parásitos tienen un ciclo de vida digenético, con dos morfotipos distintos (Figura 1). El morfotipo promastigote que se caracteriza por ser: alargado, flagelado y móvil; se desarrolla en el aparato digestivo del flebótomo (insecto vector). El morfotipo amastigote, es redondeado, sin flagelo aparente y sin movilidad. Este se desarrolla dentro de los macrófagos del sistema inmunitario del hospedador vertebrado, y representa el estadio terapéuticamente importante de la enfermedad (Orué y col, 2006; Serrano-Martín, 2010; Pérez, 2013 y López-Carvajal, 2016).

La infección del insecto ocurre cuando las hembras hematófagas pican a un hospedero mamífero infectado, ingiriendo las formas amastigotes junto con la sangre. Es en el intestino medio del vector donde los amastigotes se convierten de la forma no flagelada e inmóvil a la forma flagelada como consecuencia de cambios de pH y temperatura. Luego se multiplican rápidamente por división binaria y a los pocos días, inician el proceso de migración hacia el intestino medio torácico y a la válvula cardíaca, adhiriéndose a las microvellosidades del esófago y la faringe, por medio de su flagelo; en este proceso, el parásito sufre cambios genéticos, bioquímicos y morfológicos. Luego de ser atacados por el sistema inmunitario, los parásitos comienzan a desarrollarse dentro del sistema mononuclear del hospedador vertebrado (Serrano-Martín, 2010).

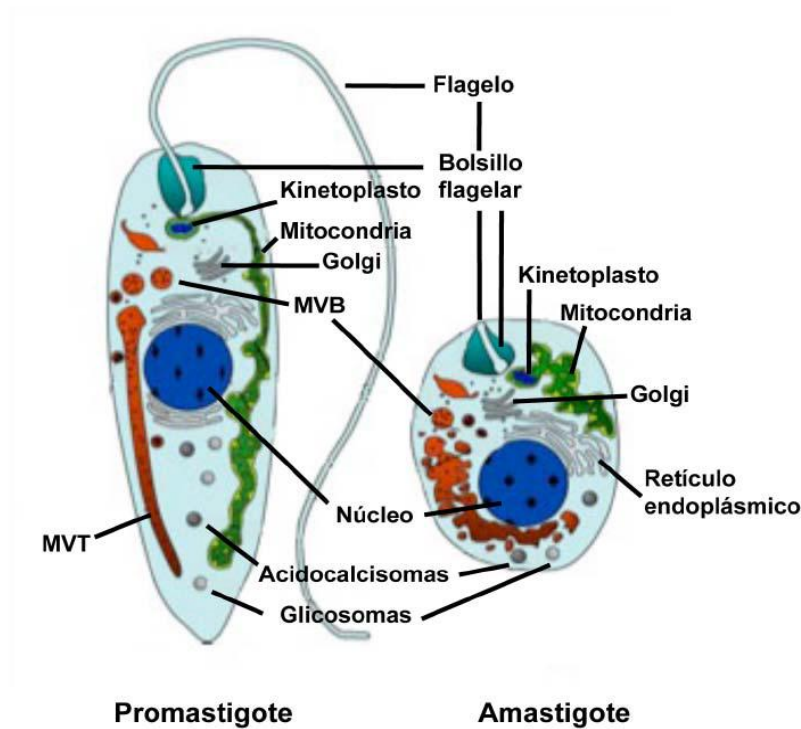


Figura 1. Ilustración de morfotipos promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania* spp. (Tomado y modificado de Pérez, 2013).

Una vez dentro de los macrófagos, los parásitos son incluidos en vacuolas fagolisosómicas en las que se transforman en formas amastigotas. Éstas se dividen por fisión binaria hasta romper la célula, liberándose al torrente sanguíneo para invadir diferentes tejidos donde serán nuevamente fagocitadas por macrófagos. El ciclo se completa cuando el insecto vector ingiere sangre con macrófagos infectados con formas amastigotas. Con esto, se inicia el desarrollo del parásito dentro del tracto digestivo del vector hasta transformarse, mediante un proceso conocido como metaciclologénesis, en formas promastigotas metacíclicas, que podrán ser inoculados a un nuevo hospedador vertebrado (Pérez, 2013). (Figura 2).

Manifestaciones clínicas de la Leishmaniasis

La Leishmaniasis puede presentarse con distintas manifestaciones clínicas, en función de la especie de *Leishmania* responsable de la enfermedad, y también de las características genéticas e inmunológicas de la persona infectada. La Leishmaniasis visceral (LV), también llamada kala-azar, es la forma más severa de la enfermedad, y puede ser mortal tras unos meses en ausencia de tratamiento. Es causada principalmente por *L. donovani* en el este de África y en la India, y por *L. infantum* y *L. chagasi* en Europa, el norte de África y Latinoamérica. Se caracteriza por una infección visceral generalizada del sistema retículo-endotelial, que da lugar a episodios de fiebre, pérdida de peso, hepato y esplenomegalia y anemia (Pérez, 2013).

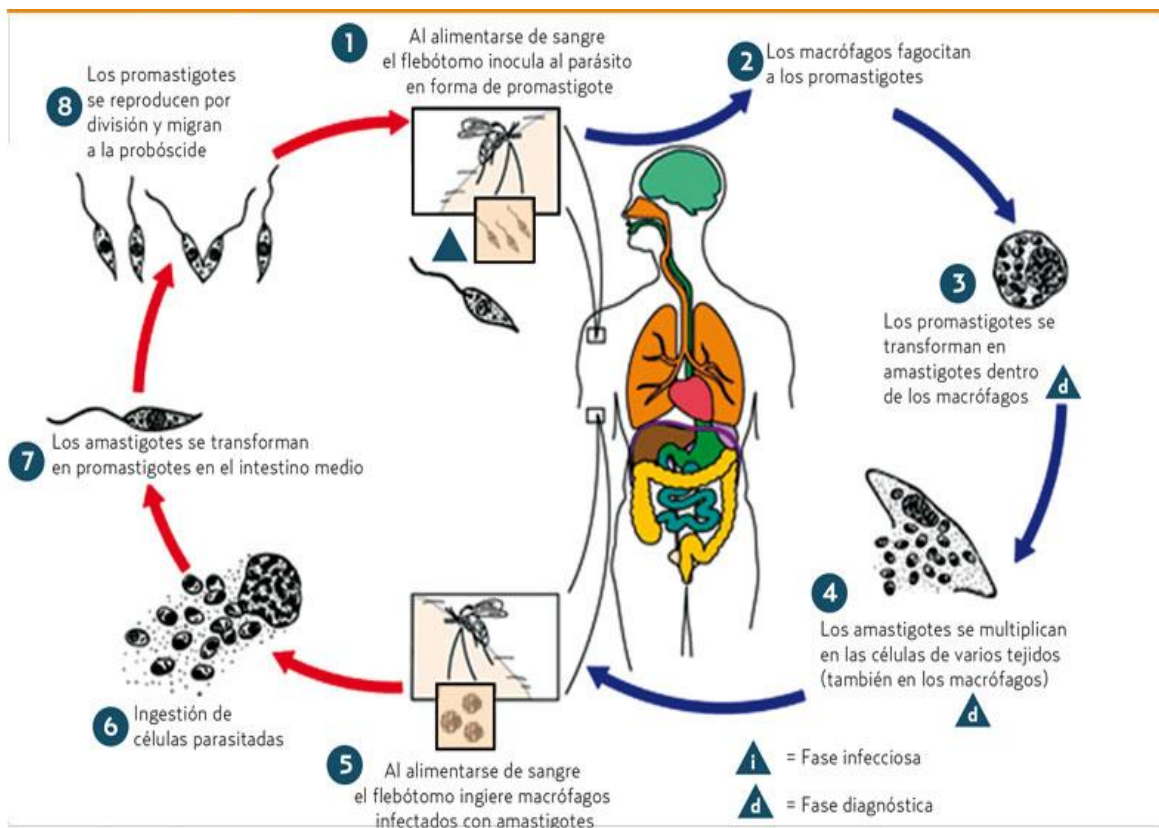


Figura 2. Ciclo biológico de Leishmania. Tomado y modificado de <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

La Leishmaniasis cutánea, también denominada botón de oriente, es la forma más común de la enfermedad, y es producida principalmente por *L. major* y *L. tropica*. La enfermedad se caracteriza por úlceras cutáneas en el lugar de picadura del mosquito, que pueden dar lugar a cicatrices permanentes. La Leishmaniasis mucocutánea, conocida en nuestras comunidades como llaga brava, es una afección de las selvas tropicales amazónicas, causada por *L. braziliensis*. La primera lesión ocurre en el sitio de la picadura del insecto transmisor, pero la infección también compromete el sistema mucoso de la cavidad nasal y bucal que pueden conducir a la destrucción parcial o total de la membrana mucosa de la nariz, boca y garganta (Calvay-Sánchez y col, 2015).

Epidemiología de la Leishmaniasis

La cadena epidemiológica de la enfermedad está conformada por el animal parasitado, el insecto vector y el sujeto susceptible. Este tipo de patologías afectan en gran medida la calidad de vida de personas con pocos recursos económicos. Por esta razón, representan un grave problema de salud pública en diversos países del mundo y particularmente en Venezuela (Serrano-Martín, 2010).

Garrido y Bonfante, 2002 reportaron que la Leishmaniasis en Venezuela es endémica y se encuentra distribuida en todos los estados del país. Desde 1955 al 2002 se reportaron cerca de 50.000 casos de LC y más de 2.000 casos de LV. La enfermedad es predominante en alturas entre 0-1.800 metros sobre el nivel del mar. Los vectores más frecuentes para la LC son *Lutzomyia ovallesi*, *Lutzomyia gomezi* y *Lutzomyia panamensis* mientras que los agentes causales son *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana*, siendo los principales reservorios varias especies de ratones salvajes. Tanto *L. chagasi* como *L. infantum* han sido

identificados como agentes causales de LV, utilizando como vector *Lutzomya longipalpis* y *Lutzomya evansi*, y a los perros como principal reservorio. (Serrano-Martín, 2010).

Durante el año 2006, la tasa de casos de Leishmaniasis se ubicó en un 9,97 por 100.000 habitantes, distribuidos a lo largo de todo el territorio nacional, y con más frecuencia en regiones montañosas: Los Andes y la Serranía de la Costa. El Glucantime es la droga que se utiliza actualmente en el tratamiento de cualquier tipo de Leishmaniasis en Venezuela, a pesar de producir graves efectos tóxicos en los pacientes que la reciben (Núñez y col, 2012).

En el bienio 2008-2009, un total de 4.640 casos de las diferentes formas clínicas de LC fueron diagnosticados en Venezuela, con una media de 2.320 casos por año, y una tasa promedio anual de 8,25 por cada 100.000 habitantes. Predomina el sexo masculino con una razón de masculinidad de 1,84 para el período 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 LC localizada con 97,84% de los casos, generada por *Leishmania braziliensis*. (Núñez y col, 2012).

Data más actualizada la encontramos en el boletín epidemiológico publicado por el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) del año 2016, que registra 1.068 casos hasta la semana 52 (del 25 al 31 de Diciembre), año 2015 con 1.163 casos, año 2014 con 872 hasta la semana 44 (del 26 de Octubre al 1 de Noviembre), año 2013 con 1.041 casos.

Terapias actuales contra la Leishmaniasis.

En la actualidad no existe una vacuna eficaz ni programas de control del vector, por lo que la quimioterapia es la única herramienta de lucha frente a la Leishmaniasis. Las principales opciones terapéuticas utilizadas son:

1- Antimoniales pentavalentes. El estibogluconato sódico (Pentostam[®]) y el antimonio de meglumina (Glucantime[®]) se han usado para el tratamiento de la Leishmaniasis durante más de cinco décadas, y continúan siendo la primera línea de elección en zonas donde no se han detectado resistencias. Se administran por vía parenteral con una dosis diaria de 20 mg/Kg durante 30 días. El mecanismo de acción de estos compuestos no se conoce con exactitud; sin embargo se propone que el antimonio pentavalente (Sb^V) actúa como profármaco y luego es reducido hasta antimonio trivalente (Sb^{III}) la forma activa. Sin embargo, no se sabe si la reducción tiene lugar en el parásito, en el macrófago del hospedador o en ambos. Se sabe además, que los antimoniales actúan a distintos niveles y afectan al metabolismo bioenergético de *Leishmania* spp, al inhibir la glucólisis, la betaoxidación de ácidos grasos y la fosforilación de ADP. Además, se ha demostrado que alteran el potencial redox tiólico de formas promastigotas y amastigotas del parásito al promover el flujo de tioles intracelulares, lo que induce una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Tanto el Sb^{III} como el

Sb^V producen una muerte del parásito mediante fragmentación del ADN. Los tratamientos de larga duración con estos fármacos provocan su acumulación, principalmente en hígado y bazo, lo que da lugar a diversos efectos adversos, tales como arritmias cardíacas, pancreatitis y hepatotoxicidad (Mesa y col, 2008 y Pérez, 2013)

2- Anfotericina B (Fungizone[®]). La anfotericina B (Figura 3) es un producto natural obtenido de *Streptomyces nodusus*, un actinomiceto del suelo, que actualmente representa el fármaco más prometedor en el tratamiento de la Leishmaniasis visceral y mucocutánea en regiones en las que hay alta resistencia al tratamiento

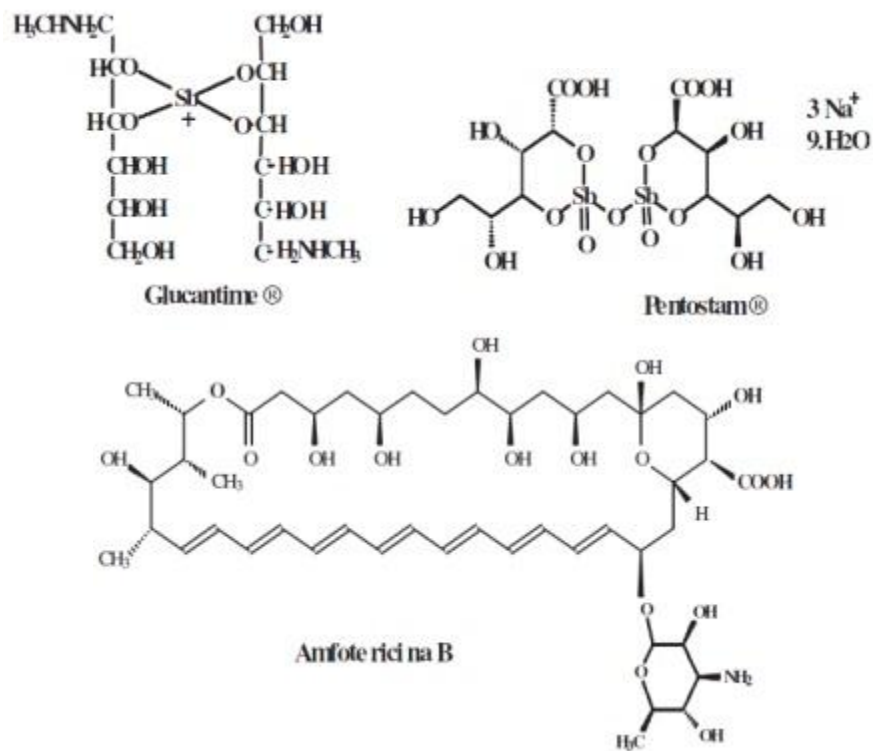


Figura 3. Medicamentos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis (Tomado Calvay-Sánchez, 2015).

con antimoniales. Su estructura química consiste en un anillo de lactona macrocíclica, que por un lado contiene una cadena de polienos hidrofóbica y por el

otro una cadena hidrofílica con siete grupos hidroxilos. Además, el anillo macrólido contiene un ácido carboxílico y el aminoazúcar micosamina unido mediante un enlace glucídico. La anfotericina B actúa a nivel de los esteroides de la membrana del parásito, produciendo un aumento en la permeabilidad que conduce a la muerte del parásito. Su estructura con una mitad hidrofóbica, compuesta por dobles enlaces, y una mitad hidrofílica que contiene grupos hidroxilo, es ideal para actuar en la membrana celular. Varias moléculas de anfotericina B se agrupan dejando la cadena de alquenos hacia el exterior, formando poros con los grupos hidroxilos hacia el interior. De este modo se inserta en la membrana de la célula permitiendo que el contenido polar de la misma salga de ella por el interior hidrofílico de los poros, lo que conduce a la muerte celular por un mecanismo osmótico). Entre los efectos secundarios producidos se encuentran: fiebre, escalofríos, tromboflebitis y efectos hematológicos (Pérez, 2013).

3- Miltefosina (Impavido®). El primer fármaco oral frente al tratamiento de la Leishmaniasis (Figura 4); es una alquilfosfocolina, que pertenece al grupo de los alquilfosfolípidos, en los que la fosfocolina se esterifica con un alcohol de cadena larga. A pesar de que su actividad antineoplásica y leishmanicida se descubrieron simultánea, aunque independientemente, a principios de la década de 1980, se desarrolló primero como un fármaco anticanceroso. En 2002, la miltefosina se registró como el primer fármaco oral para el tratamiento de la LV, y desde entonces se ha estado usando en la India de forma exitosa. Con dosis diarias de 50 mg/kg en el caso de niños o 100 mg/kg en adultos, durante 28 días, se han logrado tasas de curación superiores al 90 % en la India (Pérez, 2013).

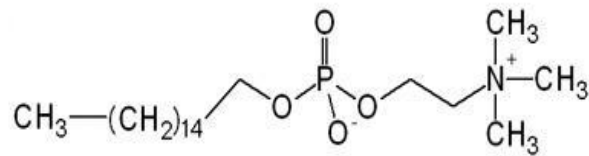


Figura 4. Estructura química de la Miltefosina. (Tomado y modificado <http://www.iqb.es/diccio/m/mi3.htm>)

El mecanismo de acción leishmanicida de este compuesto no está del todo claro, pero se ha sugerido que actúa a nivel del metabolismo de alquilfosfolípidos, metabolismo del inositol, activación de la fosfolipasa, proteína quinasa C y otras rutas mitogénicas, produciendo la muerte del parásito por un mecanismo similar a la apoptosis.

Los efectos adversos de este fármaco, principalmente molestias gastrointestinales y toxicidad renal, son reversibles y no muy graves. Sin embargo, produce efectos teratogénicos por lo que está contraindicado en mujeres embarazadas e infantes. Inicialmente se consideró la terapia ideal en el tratamiento de la Leishmaniasis, con una eficiencia del 94 % en LV y del 33-91 % en LC, pero la aparición de resistencias está determinando un uso controlado en las zonas endémicas. Recientemente, han aumentado los casos de fallo terapéutico de la miltefosina oral en la India. El desarrollo de resistencias a miltefosina se debe tanto a factores intrínsecos del fármaco, principalmente su larga vida media (150-200 h), como a factores extrínsecos derivados de una práctica inadecuada, consecuencia del alto precio de la miltefosina y de la falta de control médico (Pérez, 2013).

La recomendación más reciente de la OMS para el tratamiento de la Leishmaniasis, se basa en la aplicación de terapias combinadas de fármacos. La razón de esto, es indagar en presuntos efectos sinérgicos entre estos productos, que generen a su vez la disminución de dosis de tratamiento y con esto los efectos adversos asociados (Calvay-Sánchez, 2015).

Investigaciones y estudios actuales. En búsqueda de nuevos blancos y candidatos quimioterapéuticos.

La investigación de nuevas dianas farmacológicas, actualmente se fundamenta en el estudio a fondo de diversas rutas bioquímicas y metabólicas esenciales para la supervivencia del parásito. Dentro de éstas, ha preponderado la búsqueda de enzimas que presenten diferencias estructurales y/o funcionales significativas con su contraparte en mamíferos. Entre las vías metabólicas del parásito que ha sido estudiadas destacan la ruta del metabolismo de purinas, el metabolismo de tioles y poliaminas, la biosíntesis de folato, la replicación del ADN, la ruta glicolítica así como la biosíntesis de ácidos grasos y de esteroides. Todos estos estudios permitirán identificar un conjunto de compuestos novedosos, con potencial actividad sobre *Leishmania* spp (Serrano-Martín, 2010)

El blanco quimioterapéutico en *Leishmania* spp. es el amastigote intracelular, que sobrevive y se divide dentro de la vacuola parasitófora de los macrófagos, en un pH ácido de 4,5-5,0. Este ambiente ácido influye de manera importante en la homeostasis y la estrategia de obtención de nutrientes del amastigote. (Serrano-Martín, 2010).

Un aspecto interesante de la biología de los tripanosomátidos es su capacidad de sobrevivir en una amplia gama de condiciones medioambientales extremas y altamente fluctuantes. La regulación del volumen en parásitos tripanosomátidos, es un mecanismo homeostático presente en todas las células con excepción de los que tienen una pared celular. La mayoría de las células responden a los cambios osmóticos por expansión o contracción a través de la activación de un número de transportadores y vías metabólicas que devuelven las células a su volumen original, permitiendo así que estas se adapten a las nuevas condiciones ambientales. Tras la exposición a una reducción de la osmolaridad externa, las células se hinchan inicialmente, pero pronto recuperan un volumen casi normal mediante un proceso que se ha denominado Disminución del Volumen Regulatorio (RVD, por sus siglas en inglés), que se acompaña del flujo de varios iones inorgánicos (como Na^+ y K^+), y osmolitos orgánicos, incluyendo glicerofosforilcolina, sorbitol, inositol, betaína y aminoácidos (Docampo y col. 2013).

Se supone que el eflujo se produce a través de un canal aniónico de osmolito orgánico no específico, sensible al volumen (VSOAC) que puede mediar el flujo de salida tanto de los osmolitos orgánicos como de los iones inorgánicos. Los candidatos moleculares para este VSOAC son numerosos, aunque es poco probable que sólo un solo canal sea responsable de todas las observaciones a través de múltiples tipos de células. También debe tenerse en cuenta que, en muchos de los sistemas de vertebrados mejor caracterizados, la contribución del eflujo de iones inorgánicos a la RVD, es muchísimo mayor a la de los osmolitos orgánicos (Docampo y col. 2013).

En contraste con las células de vertebrados la mayoría de los protistas viven en ambientes de baja osmolaridad y su mecanismo de regulación de volumen parece diferir. Mientras que los protistas con una pared celular rígida resisten la hinchazón en estos ambientes, varios protistas carentes de pared celular poseen un complejo de vacuola contráctil (CVC), el cual acumula y expulsa el exceso de agua. Algunos protistas también necesitan lidiar con condiciones de alta osmolaridad bajo ciertas circunstancias, y también se ha demostrado un papel para el CVC en estas condiciones (Docampo y col. 2013).

Considerando: (a) los altos efectos adversos reportados para los fármacos de primera línea, (b) los extensos reportes de resistencia parasitaria a alternativas terapéuticas como Miltefosina, (c) la importancia de la integridad de la membrana plasmática para soportar variaciones osmóticas extremas entre insecto vector-hospedero final y (d) el papel fundamental del amastigote intracelular en la aparición de signos y síntomas de la enfermedad; pareciera clara la necesidad de investigar en nuevas alternativas terapéuticas y nuevos blancos de acción, contra *Leishmania* spp.

En este orden de ideas, sobresalen en la bibliografía, estudios referentes al efecto biológico que presentan los derivados de quinolinas y piridinas. Estos, son compuestos que contienen nitrógenos heterocíclicos aromáticos, presentes en un amplio número de fármacos contra el cáncer. Conocida la amplia gama de propiedades biológicas y bioquímicas exhibidas por derivados de quinolina y piridina de manera independiente, vemos en la bibliografía estudios recientes, orientados a la combinación de estos dos andamios en una sola molécula. Las moléculas resultantes, reciben el nombre de Piridinilquinolinas, y han mostrado ser

activas contra diversos tipos de Cáncer (Kouznetsov y col, 2017). A continuación, mostramos una serie de estudios representativos y que dan cuenta de la actividad biológica de las Piridinilquinolinas.

Kouznetsov y col., 2006. Evaluó el efecto de la actividad citotóxica *in vitro* la síntesis de 3 derivados de 7H-indeno[2,1c]quinolina sobre células de cáncer de seno (MCF-7) y la actividad fungicida sobre un panel de 10 hongos patógenos oportunistas incluyendo levaduras. Los resultados de los ensayos antifúngicos mostraron que todos los compuestos fueron desprovistos de propiedades antifúngicas contra levaduras y especies de *Aspergillus* (MIC > 250 mg/mL). Sólo cinco compuestos son activos contra dermatofitos con valores de CIM > 20 mg/mL. Es interesante observar que los compuestos más citotóxicos fueron completamente desprovistos de propiedades antifúngicas, lo que sugiere claramente una toxicidad selectiva de estos compuestos frente a líneas celulares de cáncer.

Ghorab y col., 2010. Presentó la síntesis de nuevos derivados de quinolina: pirimidoquinolina y triazolopirimidoquinolina. La proyección contra el cáncer se llevó a cabo contra una línea humana de células de cáncer de mama (MCF7). También se intentó evaluar la capacidad de la γ -radiación sobre células para sensibilizar la actividad citotóxica *in vitro* de los compuestos más activos. De los resultados obtenidos se observó que los derivados de quinolina (derivado 6, EC₅₀: 8.5 μ M), 4-cloro-pirimidoquinolina (derivado 14, EC₅₀: 23.5 μ M) exhibieron mejor actividad que la referencia Doxorubicina (EC₅₀: 32.02 μ M); mientras que los compuestos 9, 11, 17 y 18 mostraron valores EC₅₀: (36.4, 39.7, 39.02 y 36,4 μ M,

respectivamente) son casi tan activos como Doxorubicina como control positivo. Mientras que los otros compuestos mostraron valores inferiores EC_{50} a la de la Doxorubicina, medicamento de referencia (42.9 – 53) μM .

Bompart y col., 2013. Evaluó el efecto *in vitro* de 13 derivados de Quinolinas (C-2 sustituidas) sobre la viabilidad de *L. braziliensis* y su célula hospedera (macrófagos BMDM). Mediante evaluaciones con MTT, seleccionó al derivado 5f, debido a su potente efecto sobre *L. braziliensis* y su baja toxicidad sobre células de mamífero. A través de la construcción de curvas de crecimiento de promastigotes de *L. braziliensis*, determinaron un valor de EC_{50} de 6 μM . Con la finalidad de establecer posibles mecanismos de acción, evaluó el potencial electrogénico mitocondrial, la acidez de los acidocalcisomas y el contenido de esteroides libres en promastigotes expuestos a 5f. Utilizando técnicas de fluorescencia determinó que el 5f generó un potente efecto desestabilizador del potencial mitocondrial, así como alcalinización de acidocalcisomas en estos parásitos. Mediante cromatografía de gases acoplada a masas, logró determinar que este compuesto afecta la actividad de la enzima escualeno epoxidasa, generando la acumulación del intermediario escualeno en la ruta de síntesis de esteroides. Al evaluar el efecto del 5f sobre amastigotes intracelulares (estadio clínicamente relevante de la enfermedad) encontraron un EC_{50} : 20 μM , menor efecto al observado para promastigotes, pero aún significativo dado que no se observó efecto significativo sobre la célula hospedera con incluso, concentraciones mayores a 100 μM . Estos resultados, proyectan el desarrollo de estructuras quinolinicas como potenciales candidatas contra la Leishmaniasis y

describen dos mecanismos de acción antiparasitarios validados en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación.

Serrano-Martín y col., 2012. Reportaron, el desarrollo y evaluación de 10 nuevos derivados de tetrahydroquinolinas base, sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*. Utilizando el ensayo colorimétrico MTT, obtuvieron los siguientes resultados. (1) *L. braziliensis*: 9 derivados con valores de $EC_{50} < 50 \mu M$ e inocuos para sus células hospederas (Macrófagos BMDM) a una concentración de $300 \mu M$. De los 9 derivados, 6 fueron más activos que el fármaco leishmanicida y de uso comercial Miltefosina. El derivado con mayor actividad leishmanicida fue el **JS87**, con un porcentaje de inhibición de la proliferación parasitaria del 90 %. Si bien estos estudios fueron realizados sobre promastigotes de *L. braziliensis* (estadio extracelulares), la alta toxicidad selectiva para los parásitos valida la realización de nuevos ensayos con modelos más avanzados tales como: amastigotes intracelulares y ratones Balb/C infectados.

Carbajo, 2013. Evaluó el efecto de 2,1-C-quinolinas-piridil sustituidas sobre *L. mexicana*. Ensayos de citotoxicidad sobre la forma promastigote, revelaron una actividad citotóxica con valores de EC_{50} de 2,0 a $31,8 \mu g/ml$, siendo los compuesto 2-piridil sustituidos, en general, los más activos de la serie ensayada, con valores de citotoxicidad cercanas a los fármacos comerciales actualmente utilizados para el tratamiento de la Leishmaniasis (Anfotericina B y Miltefosina).

Pérez, 2013. Evaluó 10 compuestos bispiridínicos frente a formas promastigotas y amastigotas intracelulares de *L. donovani* y *L. major*. Todos los compuestos presentaron una alta actividad leishmanicida frente a formas promastigotas y amastigotas intracelulares de *L. donovani*. Todos los compuestos

mostraron valores de EC_{50} inferior a 1 μM en formas promastigotas, con la excepción del compuesto VGP-138 (2,11 μM). Estos valores aumentaron ligeramente en las formas amastigotas intracelulares, pero la actividad fué comparable a la de la miltefosina. Ambos compuestos tienen como cabeza catiónica la 4-bromo-*N*-metilanilino piridina, lo que sugiere que la presencia del bromo disminuye la actividad leishmanicida frente a *L. major*.

Coa y col, 2015. Reportaron la síntesis y la actividad leishmanicida de diez híbridos quinolina-hidrazona. Los compuestos sintetizados se evaluaron contra amastigotes de *L. panamensis*. A su vez, evaluaron en macrófagos humanos la citotoxicidad. Los derivados 6b, 6c y 8 mostraron actividad contra *L. panamensis* con EC_{50} de 21.2 μM , 2,6 μM y 11,1 μM , respectivamente. El análisis de los resultados obtenidos, indicaran que la actividad antiparasitaria está relacionada con la presencia de una sustitución en el carbono de la molécula de quinolina (núcleo isoquinolínico) y el grupo hidroxilo en las posiciones 3 y 4 del anillo aromático. A pesar que la mayoría de estos compuestos resultaron ser altamente citotóxicos para macrófagos, su alta actividad antiparasitaria, los plantea como posibles estructuras base para generar nuevas moléculas activas.

En base a todo lo anteriormente expuesto nos propusimos evaluar el efecto de derivados de piridilquinolinas, sobre la viabilidad de promastigotes, macrófagos BMDM y amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*. Adicionalmente proyectamos averiguar, la presunta relación entre el potencial efecto antiparasitario y los mecanismos de osmorregulación intracelular.

Objetivos

Objetivo General.

Evaluar el efecto de 11 nuevos compuestos derivados de Piridinilquinolinas C6-C4-sustituidas, sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*. Del mismo modo, pretendemos explicar parcialmente el posible efecto observado, a través del estudio de procesos de osmorregulación parasitaria.

Objetivos Específicos

1. Evaluar mediante MTT, el efecto antiparasitario de Piridinilquinolinas sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*.
2. Evaluar mediante MTT, el grado de citotoxicidad de Piridinilquinolinas seleccionadas, sobre macrófagos BMDM.
3. Determinar mediante curvas de crecimiento parasitario, el efecto de Piridinilquinolinas seleccionadas, sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis*.
4. Estudiar el efecto de Piridinilquinolinas seleccionadas, sobre la Osmorregulación en promastigotes de *Leishmania braziliensis*.
5. Determinar el efecto de Piridinilquinolinas seleccionadas, sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*.

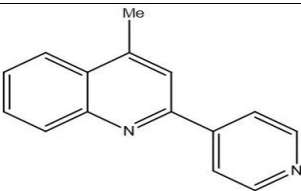
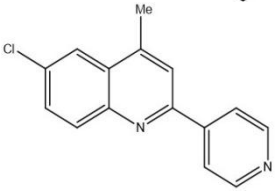
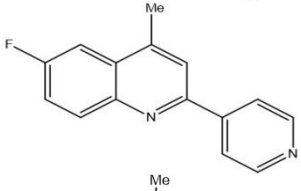
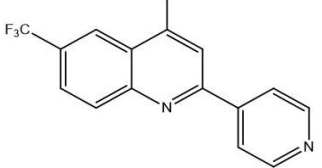
Materiales y métodos

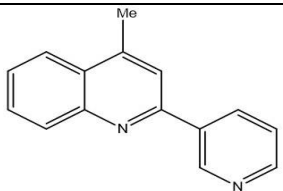
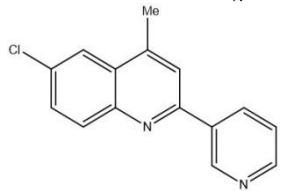
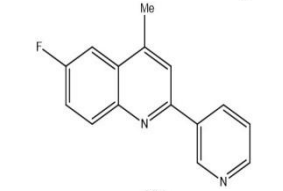
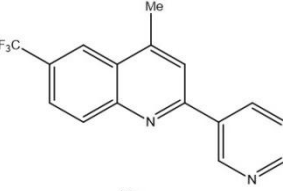
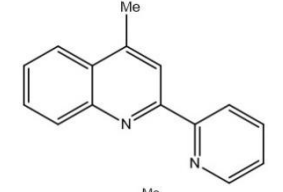
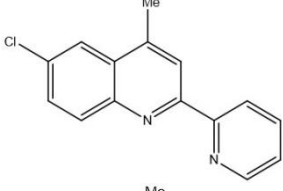
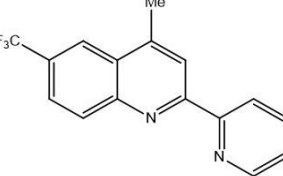
Materiales-Reactivos.

Todas las soluciones fueron preparadas con reactivos adquiridos en las casas comerciales SIGMA, Promega, Invitrogen, Gibco B.R.L. y BIO-RAD. Las soluciones y los materiales fueron esterilizados en autoclave a 121 °C, 15 libras, durante 30 minutos.

Compuestos a ensayados.

Tabla 1. Derivados de Piridinilquinolinas utilizados en pruebas biológicas leishmanicida. Los compuestos fueron sintetizados en Bucaramanga-Colombia, Universidad Industrial de Santander por el Dr. Vladimir Kouznetsov y fueron cedidos gentilmente por el Dr. Francisco Arvelo del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos Humanos-IDEA.

Compuesto	Formula molecular	Masa molecular (g/mol)	Estructura química
MR5	$C_{15}H_{12}N_2$	220,27	
MR22	$C_{15}H_{11}ClN_2$	254,71	
MR23	$C_{15}H_{12}FN_2$	238,26	
MR24	$C_{16}H_{11}F_3N_2$	288,27	

MR25	$C_{15}H_{12}N_2$	220,27	
MR26	$C_{15}H_{11}ClN_2$	254,71	
MR30	$C_{15}H_{12}FN_2$	238,26	
MR31	$C_{16}H_{11}F_3N_2$	288,27	
MR35	$C_{15}H_{12}N_2$	220,27	
MR36	$C_{15}H_{11}ClN_2$	254,71	
MR38	$C_{16}H_{11}F_3N_2$	288,27	

Material Biológico

Tabla 2. Filogenia del parásito utilizado en este estudio.

Género (Subgénero)	Especie	Cepa	Origen
<i>Leishmania (V.)</i>	<i>braziliensis</i>	MHOM/CO/87/UA301	Colombia

Cultivo celular.

Los aislados de promastigotes de *Leishmania braziliensis* se mantuvieron en frascos de cultivo (T25) con medio de cultivo (LIT) suplementado con Hemina (20 mg/L), Suero Fetal Bovino inactivado al 10 %, y se incubaron a temperatura ambiente (29°C). El medio LIT con Hemina, es un medio de cultivo de parásitos que consta de todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de los mismos. Este medio contiene: una solución orgánica (triptosa 15gr/L, extracto de levadura 5gr/L y extracto de hígado 2gr/L) y una solución inorgánica (C₆H₁₂O₆ 4gr/L, NaCl 9gr/L, KCl 0,4gr/L y Na₂HPO₄ 7,5gr/L). 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 procedió a incubar el suero a 57°C por 45 min (Benaim y col, 2006).

El cultivo de las células hospederas (BMDM), se realizó en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado con 10 % de suero fetal bovino,

en frascos de cultivo (T25). El medio DMEM contiene 4,5 g/L D-glucosa, 584 mg/L L-glutamina y 3.7g/L de bicarbonato de sodio. Este tipo celular, se mantuvo en incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂ (Benaim y col, 2006).

Ambos medios de cultivo fueron suplementados con el coctel de antibióticos ampicilina-estreptomicina (1 µg/mL), con la finalidad de prevenir posibles contaminaciones, ya que por su composición, son medios muy ricos en nutrientes colonizables por otras especies celulares distintas a la de nuestro interés.

Evaluación preliminar del efecto de compuestos derivados de Piridinilquinolinas sobre la viabilidad de promastigotes de Leishmania braziliensis y de células BMDM: MTT

Se colocó en placas de 96 pozos, 1x10⁶ promastigotes por pozo y se incubaron a 29 °C por 24 horas. Posteriormente, se agregaron los compuestos a evaluar en una concentración única de 20 µM más un control sin droga (control negativo). Para seleccionar aquellos compuestos activos sobre promastigotes de *L. braziliensis*, se incubaron durante 72 horas luego de agregados los compuestos a evaluar y posteriormente se añadió el reactivo MTT (5 mg/mL), incubándose por 4 horas en oscuridad. Finalmente se procedió a lisar las células con isopropanol ácido y la placa fue leída en un espectrofotómetro a 570 nm. Este mismo ensayo se realizó en células BMDM con modificaciones menores, agregando 20x10³ células/pozo y evaluando, los compuestos seleccionados a una concentración de 20 µM, Miltefosina como control positivo y un segundo control sin compuesto alguno. Se sometió las células a una concentración única de cada compuesto, con

la intención de evaluar su citotoxicidad sobre células BMDM. Ahondando un poco en el fundamento de esta metodología, en células vivas (parásitos de *L. braziliensis* o células BMDM) 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 570 nm. 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 producidos es proporcional al número de células vivas presentes (Berridge y Tan, 1993).

Evaluación del efecto de compuestos derivados de piridinilquinolinas, sobre la viabilidad de promastigotes de Leishmania braziliensis: curva de crecimiento, dosis-respuesta y cálculo de EC₅₀.

Las curvas de crecimiento nos permitieron observar de manera directa el crecimiento de la población celular en cultivo, evaluando así, el efecto de compuestos candidatos sobre la viabilidad de las células en cuestión.

Luego de verificar a través del microscopio óptico, la inexistencia de algún tipo de contaminante en el cultivo parasitario, fue realizada una dilución adecuada que permitió determinar con exactitud el número de parásitos existentes en el cultivo original. La dilución del cultivo de parásitos se llevo a cabo en tubos “ependorf” a los cuales se le añadió un volumen de buffer PBS estéril, y formaldehído al 0,1 mg/mL de concentración final. El formaldehído, inmoviliza los

parásitos en la cámara mediante la interacción directa con proteínas del flagelo haciendo posible un conteo correcto. Finalmente, se agregó al tubo, un volumen adecuado de parásitos (según la dilución estimada) provenientes del cultivo original y se procedió a contar en la cámara de Neubauer. La determinación de la cantidad de parásitos/ml, se realizará a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Parásitos/mL} = \frac{\text{totaldeparásitos}}{4} \times \text{factor dedilusión} \times 10^4$$

El conteo en cámara de Neubauer nos permite estimar a través de un conteo directo, el número de células que se encuentran en el cultivo. Conociendo el volumen de la cámara, el número de células que se encuentran en ese volumen y el volumen del cultivo, se estima entonces, el número de células presentes por mililitro de medio.

Las curvas de crecimiento y dosis respuesta de estos parásitos en presencia y ausencia de los compuestos a utilizar, se realizaron de la siguiente manera: inicialmente, 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 los antibióticos penicilina-estreptomicina, según lo reportado por Serrano-Martín y col. 2006. Seguidamente, y 24 horas después, se procedió a agregarle a cada frasco diferentes concentraciones de los compuestos de interés, disueltos en DMSO, 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.

La construcción de una curva dosis-respuesta con los datos de proliferación de la curva en fase exponencial franca de crecimiento, determinamos la concentración efectiva de compuesto que inhibe la proliferación del 50 % de la población parasitaria en cultivo (EC_{50}). Esta concentración de droga se obtendrá mediante el método de interpolación lineal propuesto por Huber y Koella (1993). Este propone tomar dos concentraciones (X_1 y X_2), de manera tal que la densidad de parásitos (Y_1) a la concentración de droga (X_1) (y todas las concentraciones inferiores), sea mayor que la mitad de la densidad encontrada en el control (Y_0), y que la densidad encontrada para la concentración de droga X_2 (y todas las concentraciones superiores), sea menor que la mitad de la densidad (Y_0). El EC_{50} es determinado entonces por interpolación lineal entre las concentraciones (X_1 y X_2), mediante la siguiente fórmula:

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

Este parámetro nos permitió comparar la efectividad antiparasitaria, de distintos compuestos con un criterio único.

Determinación del efecto de compuestos derivados de Piridinilquinolinas, sobre la osmorregulación intracelular en Leishmania braziliensis.

Con la finalidad de estudiar la capacidad de osmorregulación en parásitos, tanto tratados con el compuesto seleccionado por espacio de 96 horas y no tratados; promastigotes fueron recolectados a través de centrifugación a 5000 r.p.m y lavados dos veces con buffer de cloro isotónico (ISO-CI buffer: 137 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.5 mM Na₂PO₄, 20 mM HEPES, 11 mM glucosa, 1 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, pH:7.4) La osmolaridad de buffer se ajusto a 300±5 mosM, para luego resuspenderlos en buffer ISO-CI a una densidad de 1x10⁸ par/mL. Seguidamente, las células fueron distribuidas en placas de 96 pozos, a razón de 1x10⁸ parásitos/mL/pozo en un volumen total de 100 µL/pozo, por cuadruplicado. Con la finalidad de evaluar el efecto sobre la capacidad de regulación del volumen celular, se genero un estrés hiposmótico agregando a cada pozo 100 µL de agua estéril desionizada. Los cambios en la absorbancia, proporcionales a la expansión celular, fueron medidos cada 10 segundos, por 10 minutos totales, a 550 nm usando un lector de placas de Elisa. (Schoijet y col, 2008).

Evaluación del efecto de compuestos derivados de Piridinilquinolinas, sobre la viabilidad de 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 48 horas. 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 está 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 preparó una solución de células BMDM y amastigotes de *L. braziliensis*, en una proporción 1:10, es decir por cada macrófago, 10 promastigotes de *L. braziliensis*. Posteriormente, se agregó 80 μL de esta mezcla sobre vidrios cubre objeto, ubicados en placas de 12 pozos. Para garantizar el proceso de infección y la fijación de las células BMDM a la superficie, se incubó por 24 horas a 37°C y 5 % de CO_2 en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo, y luego de verificada la infección bajo microscopio, se procedió a agregar a cada pozo las concentraciones de los derivados Piridinilquinolinas seleccionados, diluidas en medio DMEM suplementado, incubándose por 96 horas en las mismas condiciones comentadas anteriormente. Con la intención de monitorear y contabilizar las células BMDM infectadas y no infectadas se utilizó la tinción Giemsa, según lo establecido por Brito y col., 2006.

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

Luego de transcurridas 96 horas, se observaron 10 campos aleatorios para cada condición experimental, determinando: número de células BMDM por campo, número de células BMDM infectadas y número de amastigotes por célula BMDM. Con estos datos, se procedió a elaborar una curva dosis-respuesta que expresa: (a) porcentaje total de células BMDM, (b) porcentaje de células BMDM infectadas

y (c) número de amastigotes por células BMDM; todos estos, respecto a concentraciones crecientes de los compuestos evaluados. (Nuñez y col., 2012; Bompart y col. 2013).

RESULTADOS

Evaluación preliminar del efecto de compuestos de Piridinilquinolinas (MR) sobre la viabilidad de promastigotes de Leishmania braziliensis, mediante MTT.

A fin de estudiar el efecto de las C6-C4-sustituidas piridinilquinolinas sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, se llevó a cabo la evaluación de 11 compuestos a través de un ensayo MTT, los cuales fueron sometidos a una concentración única de 20 μ M para cada compuesto (tabla 3). Ocho compuestos mostraron una inhibición en la proliferación celular en más de un 70 %, con respecto al control sin tratamiento (figura 5). Considerando, que varios compuestos afectaron de manera considerable la proliferación de *L. braziliensis*, se escogió el compuesto MR26 (figura 6), ya que el mismo generó la mayor inhibición de la proliferación celular y presentó mayor estabilidad en solución.

Tabla 3. Porcentaje de proliferación celular de promastigotes de *L. braziliensis* sometidos a compuestos de Piridinilquinolinas.

Compuesto	Proliferación celular (%)
MR5	<10
MR22	<40
MR23	<15
MR24	<15
MR25	<10
MR26	<5
MR30	<20
MR31	<20
MR35	<25
MR36	>80
MR38	<20

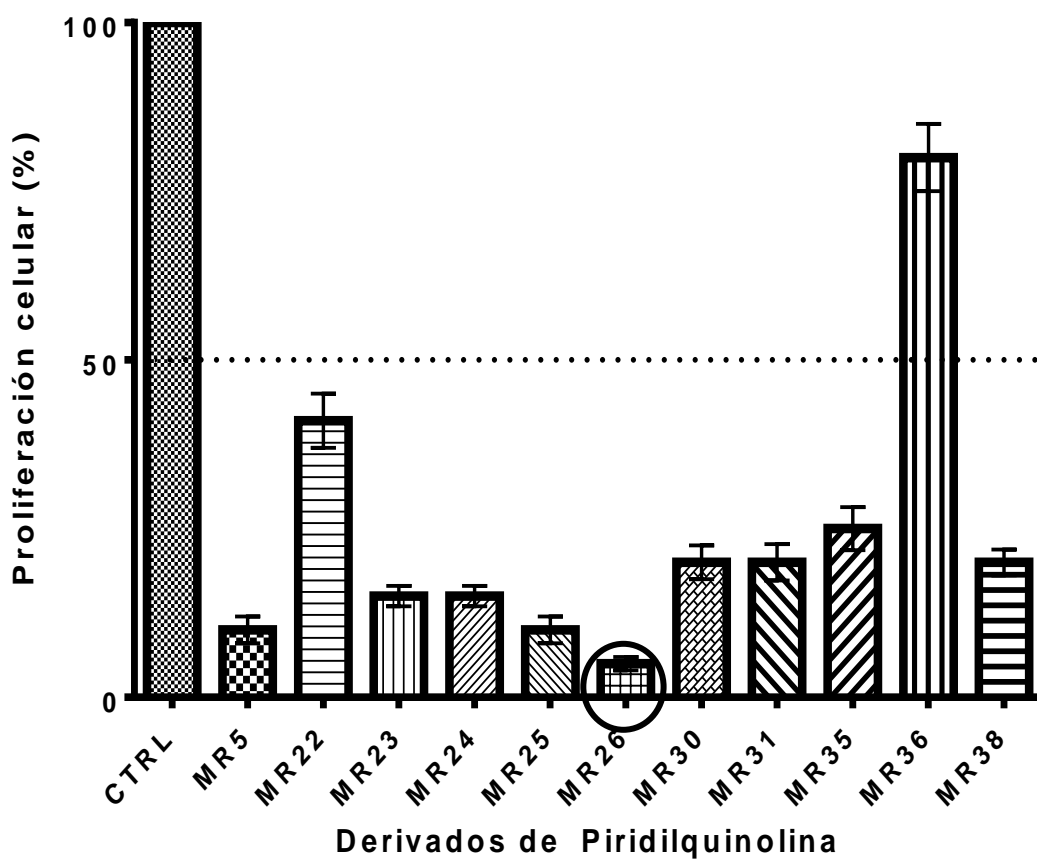


Figura 5: Derivados Piridinilquinolinas evaluados sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*, mediante en ensayo MTT. Los datos son el producto de 4 ensayos por triplicado.

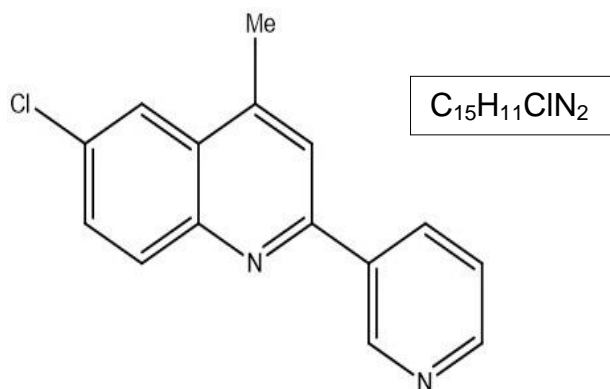


Figura 6: Derivado seleccionado para próximas fases de estudio: MR26. Estructura del derivado de Piridinilquinolinas MR26 (6-Cloro-4-Metil-2-(3-piridinil)quinolina) para la realización de pruebas biológicas leishmanicida.

Determinación del efecto del compuesto MR26 sobre la proliferación de células hospederas BMDM.

Seguidamente, procedimos evaluar la toxicidad del compuesto MR26 sobre células hospederas (macrófagos BMDM), en concentraciones crecientes, a saber: 10, 50, 100, 200 y 300 μM . Como resultado, se demuestra la baja toxicidad del compuesto sobre las células hospederas, aún a concentraciones tan elevadas como 100 μM (figura 7). Vinculando estos resultados, podemos predecir la aparente toxicidad selectiva del compuesto MR26, sobre promastigotes de *L. braziliensis*.

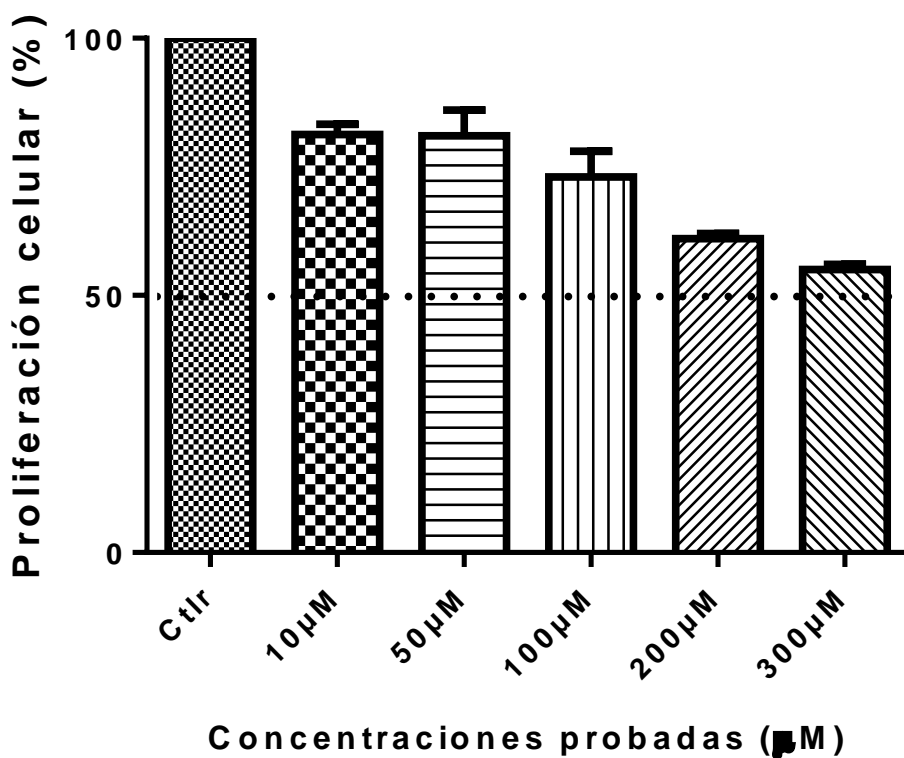
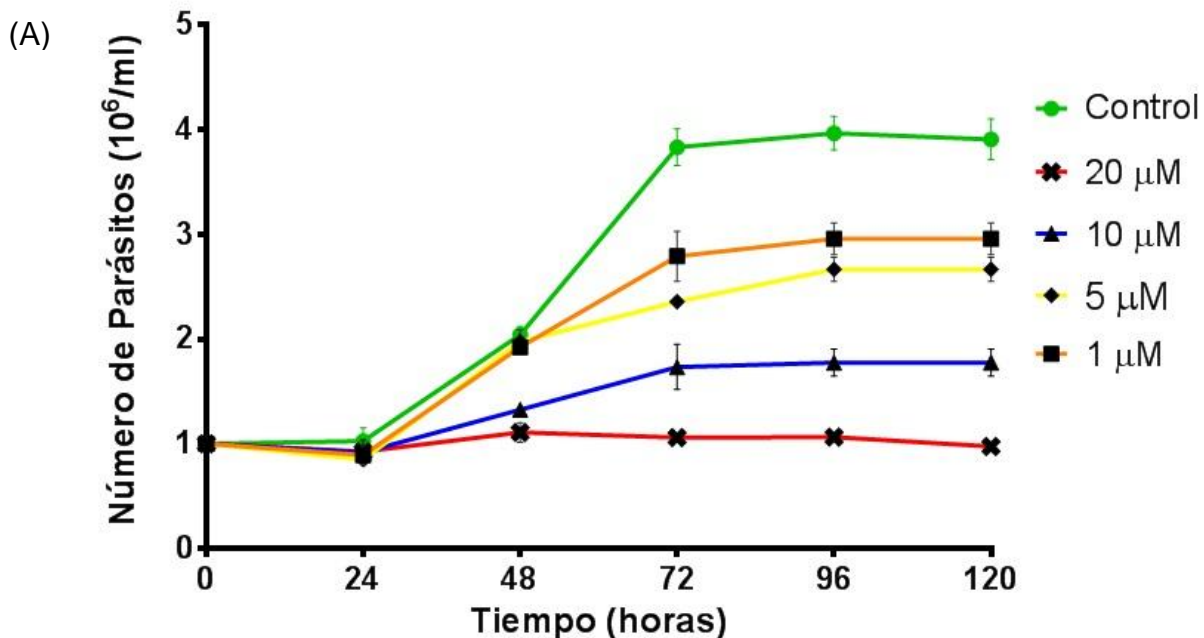


Figura 7: Proliferación celular de células hospederas (macrófagos BMDM) sometidas a distintas concentraciones del derivados MR26. Los datos son el producto de 3 ensayos por triplicado.

Evaluación del efecto del compuesto MR26, sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis*: curva de crecimiento, dosis-respuesta y cálculo de EC_{50} .

Poblaciones de promastigotes fueron expuestas a diversas concentraciones del derivado MR26, determinándose su viabilidad diaria por 6 días, a través de contejo directo (por triplicado cada condición) con cámara de Neubauer (respecto a una población de parásitos control no expuestos a compuesto alguno). Los resultados mostraron (figura 8) un efecto dosis dependiente sobre la proliferación de los parásitos ensayados. Con los datos de contejo a las 48 horas de cultivo (fase exponencial), se construyó una curva dosis respuesta. Así, partir de los datos de % de inhibición, se efectuó el cálculo del IC_{50} . Con la construcción de esta curva, fue posible determinar la concentración compuesto MR26 capaz de inhibir el 50 % de la población celular en cultivo, IC_{50} : 8.04 μ M.



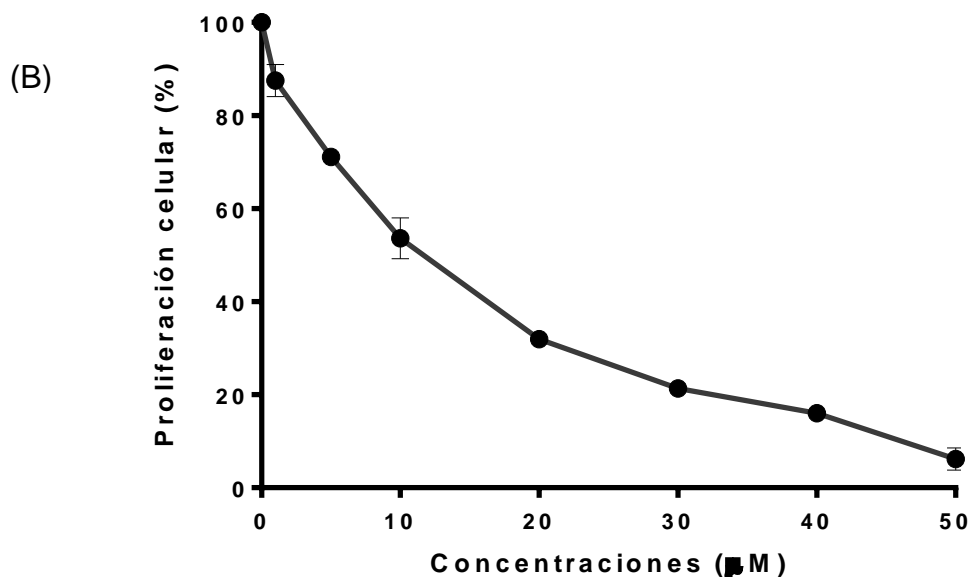


Figura 8: Susceptibilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis* a MR26. Poblaciones de promastigotes de *L. braziliensis* fueron expuestas a concentraciones crecientes de MR26. (A) Curva de crecimiento. Cada condición, fue contada en cámara de Neubauer por triplicado. (B). Curva dosis-respuesta. Se realizó una curva dosis-respuesta con los datos de 48 horas luego de agregada el compuesto. IC₅₀: 8.04 μM. Los datos son el producto de 3 ensayos por triplicado. Los datos de cada gráfico, son el producto de 3 ensayos por triplicado.

Determinación del efecto de compuestos derivados de Piridinilquinolinas, sobre la osmorregulación intracelular en Leishmania braziliensis.

Con la finalidad de evaluar la capacidad de restitución de volumen celular (RVC) de promastigotes de *L. braziliensis*, en presencia del derivado de MR26; un cultivo de células fueron incubadas por 96 horas con el mencionado compuesto a la concentración del IC₅₀ (8.04 μM), y luego se sometieron a estrés hiposmótico. Los cambios en el volumen fueron registrados por difracción de luz a una absorbancia de 550 nm.

En la figura 9, podemos observar una marcada diferencia en el comportamiento de los parásitos previamente expuestos al MR26 (**línea roja**) respecto a aquellos no tratados con compuesto alguno (**línea verde**). Si bien,

ambas poblaciones de parásitos fueron sometidos a stress hipo-osmótico, aquellos previamente incubados con MR26, fueron incapaces de restituir su volumen celular al nivel natural. Este resultado sugiere que el compuesto MR26 afecta la capacidad natural de restitución del volumen celular, en estos parásitos.

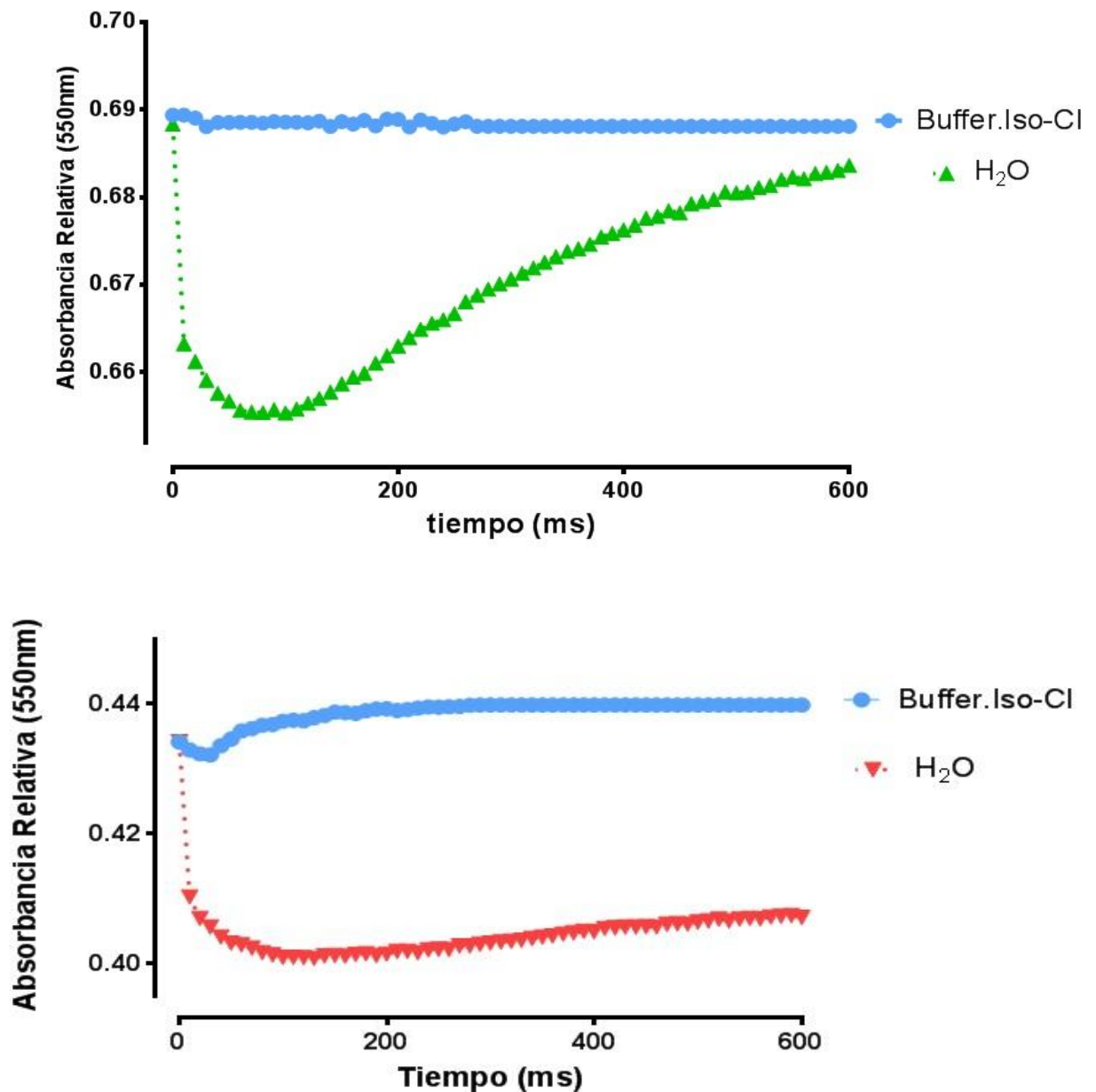


Figura 9: Regulación del volumen celular de promastigotes de *L. braziliensis* sometidos a estrés osmótico tanto para parásitos previamente tratados con MR26, $EC_{50} = 8.04 \mu\text{M}$ (curva roja) y no tratados con compuesto alguno (curva verde). Las curvas azules, representan el comportamiento del control para cada condición experimental. Los datos son el producto de 3 ensayos por triplicado.

Determinación del efecto del MR26 sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*.

Finalmente, fue determinado el efecto del MR26 sobre el estadio quimioterapéuticamente importante de la Leishmaniasis (amastigote intracelular). Para ello, procedimos a infectar macrófagos BMDM con promastigotes de *Leishmania braziliensis* (figura 10) en una proporción de un macrófago por cada diez promastigotes en cultivo (relación 1:10). Seguidamente evaluamos el efecto de diversas concentraciones de MR26 sobre: a) porcentaje de macrófagos por campo, b) porcentaje de macrófagos infectados y c) número de amastigotes por macrófago.

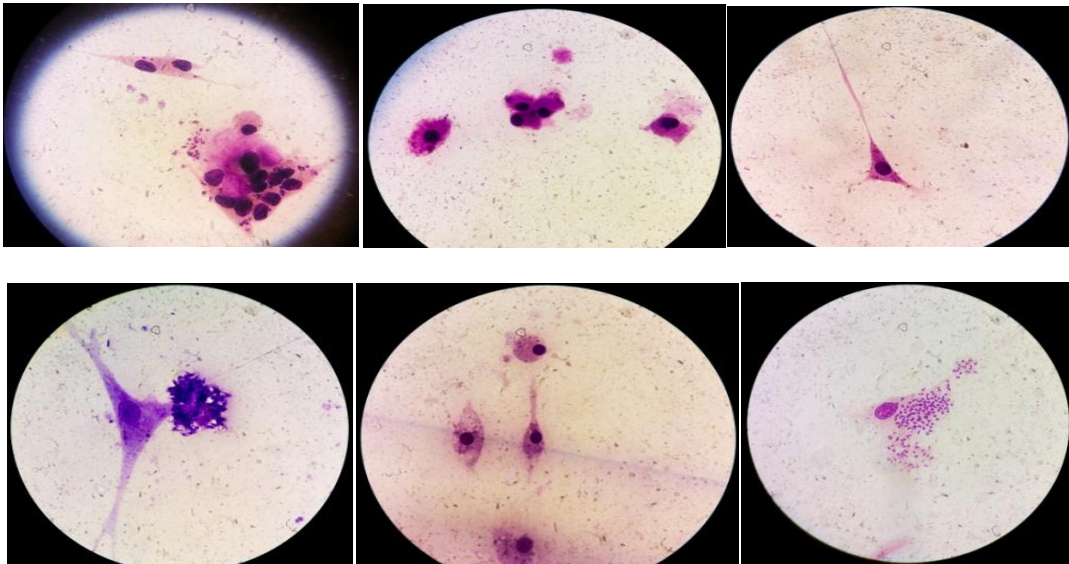


Figura 10: Infección de macrófagos BMDM con promastigotes de *L. braziliensis* en proporción 1:10.

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 entonces, que la concentración efectiva de MR26 necesaria para eliminar el 50%

de los amastigotes intracelulares en cultivo, fue de 0.72 μM (figura 11). De la misma manera se observó que el MR26 afecta muy levemente la viabilidad de los macrófagos en cultivo, siendo el efecto selectivo para los amastigotes intracelulares.

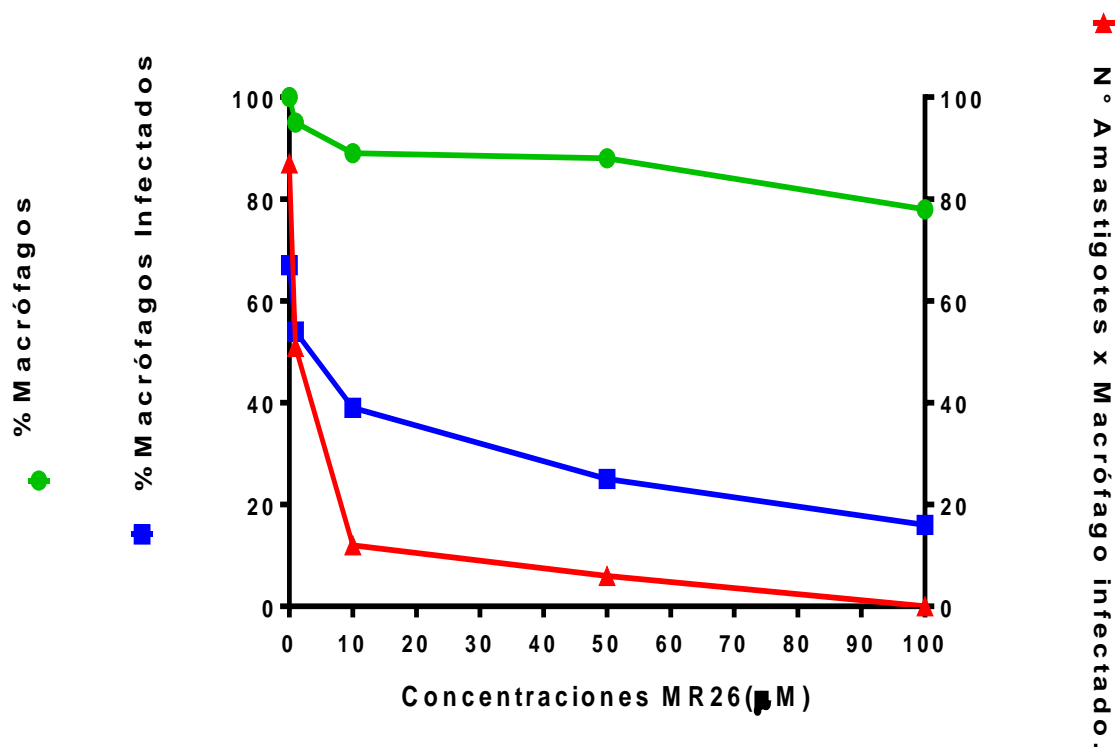


Figura 11: Efecto del MR26 sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*. Macrófagos BMDM infectados con promastigotes de *L. braziliensis* en una proporción 1:10. Porcentaje total de macrófagos en cultivo (línea verde), porcentaje de macrófagos infectados (línea azul) y Nº de amastigotes por macrófago infectado (línea roja); determinados a las 96 horas post-tratamiento. EC_{50} : 0.72 μM , para amastigotes por macrófago infectado. Los datos son el producto de 3 ensayos realizados por triplicado.

Discusión

A pesar de que actualmente existen 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.

Otras desventajas del uso de los antimoniales pentavalentes es la generación de graves efectos adversos a nivel cardíaco, renal y hepático (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 tripanosomátidos 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 hospedador infectado.

En este sentido, hemos estudiado el efecto *in vitro* de 11 derivados de Piridinilquinolinas provenientes de la hidrodestilación de frutos secos de clavos de olor (*Eugenia caryophyllus*), sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis* así como en su célula hospedera (macrófagos BMDM).

A través de ensayos de MTT, logramos determinar entonces que 10 de los 11 derivados ensayados, generaron una inhibición de la proliferación celular en más de un 50%, respecto al control no sometido a compuesto alguno (Fig. 5). Considerando que el derivado MR26 (Fig. 6), generó el mayor efecto antiparasitario, así como mejores características de solubilidad y estabilidad en solución, fue seleccionado para las siguientes fases de estudio. Adicionalmente a las evidencias anteriores, demostramos que el MR26 presenta baja toxicidad sobre macrófagos BMDM (Fig. 7) con un índice selectividad para parásitos, cercano a 15. Así, el MR26 fue 15 veces más activo sobre promastigotes de *L. braziliensis*, que sobre su célula hospedera.

De este modo y mediante la construcción de curvas de crecimiento fue posible determinar que el MR26 generó un efecto dosis-dependiente sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*, mostrando un valor de EC_{50} : 8.04 μ M (figura 8). En la bibliografía actual, no observamos estudio alguno que diera cuenta del efecto piridinilquinolinas C6-C4 sustituidas, sobre la viabilidad de *L. braziliensis*. En este sentido, contrastaremos nuestros hallazgos con estudios relacionados.

Carbajo en el 2013 reportó el efecto de 2,1-C-quinolinas-piridil sustituidas sobre la forma promastigote de *L. mexicana*, revelando una actividad citotóxica con valores de IC_{50} de 2.0-37.4 μ M, congruente con los valores obtenidos en este estudio.

Bompart y colaboradores en el 2013 evaluaron el efecto del derivado quinolínico CM100, sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*, obteniendo un valor de EC₅₀: 5.8 µM. Este valor, también es consistente con lo determinado en nuestro estudio.

Akranth y colaboradores en el 2012 reportaron que la molécula de quinolina es una base terciaria débil, que puede formar sal con ácidos y no es tóxico para los humanos por vía oral o por inhalación. Su núcleo se encuentra en varios compuestos naturales y sustancias farmacológicamente activas que muestran una amplia gama de actividad biológica. Se ha reportado que la quinolina posee actividad biológica como antipalúdico, antibacteriano, antimicótico, antihelmíntico, cardiotónico, anticonvulsivo, antiinflamatorio y actividad analgésica. Los estudios comentados anteriormente, incluyendo el nuestro, complementan lo reportado por Akranth y col., 2012, dando cuenta del efecto de derivados quinolínicos sobre *Leishmania* spp.

Otro antecedente interesante, lo representa el reciente estudio del efecto de derivados quinolínicos sobre Cáncer (Kouznetsov y col., 2017). En este caso, fue evaluado el derivado MR26, sobre el crecimiento de células de 4 líneas tumorales humanas (MCF-7, SKBR-3, PC3, HeLa). Entre ellos, podemos comentar la actividad reportada contra células PC3 (cáncer de próstata, IC₅₀: 3.77µM) y contra células SKBR-3 (cáncer de seno, IC₅₀: 8.79µM). Lo anterior demuestra la acción biológica del MR26 contra células cancerígenas y *L. braziliensis*, con índices terapéuticos similares.

En otro orden de ideas resultó interesante indagar, sobre el mecanismo de acción anti-*L. braziliensis* del MR26. Un punto interesante considerando la naturaleza digenética de *Leishmania* spp., fue evaluar el posible efecto de este compuesto, sobre un mecanismo fundamental para la sobrevivencia de este tipo de organismos: la osmorregulación intracelular.

La adaptación de varios protozoarios al estrés hipoosmótico implica, además de la liberación de iones y osmolitos, la liberación del agua que está relacionada con el complejo de la vacuola contráctil (CVC). Esta, es una estructura que consiste en una vacuola central o vejiga, rodeada de una red de túbulos y vesículas sueltas (Rholoff y Docampo, 2008). En *Leishmania* spp. y otros tripanosomátidos, el grado de expansión o contracción intracelular son determinados por el flujo aminoácidos, cationes y agua. Aunque los aminoácidos regulan el nivel de expansión, el flujo de agua a través de la acuaporina 1 afecta el grado de expansión y el proceso de Regulación del Volumen Intracelular (RVD, por sus siglas en inglés). Se ha reportado que sólo el 50 % de la RVD está regulada por aminoácidos en *Trypanosoma cruzi*, mientras que el resto es por el flujo de agua a través de la acuaporina 1 y del canal potasio. Sin embargo, en *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp., una señal, vía transducción que implica cAMP (Adenosín Monofosfato Cíclico, por sus siglas en inglés) y fosfatidilinositol 3-quinasa, participa activamente en la regulación de RVD (Imbar y col, 2013).

Una manera de cuantificar variaciones de la RVD en tripanosomátidos, es a través de la medición de los cambios en la absorbancia. Estos, son inversamente proporcionales a la expansión y contracción celular. Es decir, una disminución de

la absorbancia infiere una expansión celular debido a la formación de un gradiente osmótico en dirección al interior del microorganismo. Mientras que un aumento en la absorbancia, hace referencia a la reducción del volumen celular, debido a la formación de un gradiente osmótico desde el interior celular hacia el medio extracelular.

Considerando lo anterior, procedimos a evaluar el efecto del MR26 sobre la capacidad de regulación del volumen intracelular de *L. braziliensis* (Fig 9). Luego de someter a promastigotes de *L. braziliensis* a un shock hipoosmótico, nuestros resultados son comparables con los reportados por Mandal y colaboradores en el año 2015. El comportamiento de *L. braziliensis* en cuanto a los cambios relativos del volumen celular durante el shock hipoosmótico, son similares a los cambios del volumen celular expuesto en nuestro control. Es decir, al comienzo del shock se aprecia la disminución de los valores de absorbancia, luego el incremento paulatino en el tiempo, hasta con la formación de un plató que corresponde al valor basal.

Interesante fue el hecho que el MR26 afectara la eficiencia en el proceso de osmorregulación intracelular de *L. braziliensis*. Parásitos previamente expuestos a MR26, fueron incapaces de restituir su volumen intracelular a niveles basales, luego de generado un estrés hipoosmótico. Este resultado inédito en la literatura, indica que el compuesto MR26 afectó gravemente, la capacidad de restitución del volumen intracelular de esta especie de parásitos. Este fenómeno podría explicar en parte, el potente efecto antiparasitario del MR26.

La regulación efectiva del volumen celular en los tripanosomatídeos, luego de ser sometidos a un estrés hipoosmótico, es un proceso clave, ya que estos parásitos llevan a cabo su locomoción en presencia de un gradiente osmótico. Este fenómeno de osmotaxis ha sido propuesto como mecanismo de migración de promastigotes de *Leishmania* spp., desde el intestino medio hasta la probóscide del flebótomo, durante el ciclo de vida en el hospedador invertebrado, que es esencial para la transmisión exitosa del parásito al hospedador vertebrado (Figarella y col., 2007).

Como comentamos anteriormente, *L. braziliensis* está expuestos a múltiples y variantes condiciones externas gracias a su ciclo de vida digenético, por lo cual presentan una serie de respuestas adaptativas orientadas a la restauración de la homeostasis celular, y si estas respuestas fallan se produce muerte celular ya sea por necrosis o apoptosis. Este estudio, valida nuestra aproximación tendente a evaluar este tipo de comportamientos biológicos, como un posible mecanismo de acción de drogas.

En cuanto al desempeño del compuesto MR26 sobre el estadio clínicamente importante de la Leishmaniasis (amastigote intracelular); obtuvimos un valor de EC_{50} : 0.72 μ M. Observamos entonces que este compuesto es cerca de 12 veces más activo sobre este estadio, respecto a promastigotes de esta misma especie.

Bompart y colaboradores en el 2013 determinaron el efecto del derivado quinolínico CM100 sobre amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, reportando

un valor de EC_{50} : 20.2 μ M. Notamos entonces, que el derivado MR26, pareciera tener mayor actividad biológica sobre esta especie de parásitos.

La naturaleza orgánica de estos derivados, nos permite hacer algunos análisis en el campo de la química medicinal. En este sentido, pareciera que las modificaciones en el anillo quinolínico del MR26, aumentan la estabilidad la actividad leishmanicida del derivado. Es decir: el grupo etil de la posición 6 es susceptible a oxidaciones que hacen más polar a la molécula (por lo tanto menos lipofílica). Al modificar este sustituyente alquílico por grupos electroattractores (como el cloro por ejemplo), se bloquea la posible oxidación, así como la oxidación aromática y se obtienen análogos más lipofílicos. Lo anterior, le confiere una mayor facilidad de permear la bicapa lipídica de membranas biológicas. También es cierto que una reducción en la densidad electrónica de las posiciones del anillo quinolínico 8, 4a o ambas inclusive, pareciera clave para la actividad antiparasitaria. Es posible que ello permita que la quinolina presente una conformación que actúe de manera más favorable con un algún receptor biológico hasta ahora desconocido.

Continuando, grupos electroattractores como el cloro disminuyen el pKa de la molécula con relación al sustituyente alquílico, causando un decrecimiento considerable en la basicidad por razones de resonancia en el anillo. Esto determina la acumulación del compuesto por ejemplo, en la vacuola ácida del hospedador incrementando la actividad contra amastigotes intracelulares. Finalmente, la sustitución en el grupo fenil de la posición 2 por un bioisostero,

metabólicamente estable como la piridina, mejora la actividad biológica potencial del derivado.

Todo lo expuesto anteriormente, representarían posibles argumentos que den cuenta de la potente bioactividad del MR26 contra promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*.

Este estudio, representa el primer reporte en la literatura científica, que da cuenta del efecto biológico de derivados piridilquinolínicos, sobre la viabilidad de *Leishmania braziliensis*. Con base en los hallazgos mostrados, sería importante llevar adelante estudios detallados sobre modelos *in vivo*, que validen a las estructuras piridilquinolinicas, como potenciales alternativas para el futuro tratamiento de Leishmaniasis cutánea.

Conclusiones

1. Entre las once piridinilquinolinas sustituidas ensayadas, 10 presentaron actividad citotóxica contra los promastigotes de *L. braziliensis*, en más de 50%, respecto al control no tratado.
2. El derivado de piridilquinolina MR26, afectó la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis* a un EC_{50} : 8.04 μ M. Además determinamos que afectó gravemente la capacidad de restitución del volumen intracelular antiparasitario.
3. El derivado MR26 afectó la viabilidad de amastigotes intracelulares de manera dosis-dependiente, con un valor de EC_{50} : 0,74 μ M, afectando muy levemente la proliferación de sus células hospederas.
4. Los resultados permiten considerar a derivados de piridinilquinolinas como candidatos para continuar evaluando su potencial aplicación, como potenciales agentes terapéuticos contra la leishmaniasis cutánea.

Recomendaciones.

1. Obtener y reportar valores de EC_{50} para los siete derivados restantes con la finalidad de realizar comparaciones de configuración-actividad entre cada derivado; así recomendar los mejores candidatos para futuros ensayos alternativos.
2. Adelantar ensayos *in vivo* con derivados más activos *in vitro*, con la finalidad de iniciar el ciclo de pruebas preclínicas, de estos compuestos sobre Leishmaniasis cutánea.

Bibliografía

- **Akranth Ma., Om T., Rikta S., Mohammad A., Sandeep S., Mymoona A., Mohammad S. 2012.** Quinoline: A versatile heterocyclic. Saudi Pharmaceutical Journal (2013) 21, 1–12
- **Berridge, M. y Tan, A. 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**: 474-8.
- **Benaim G, Sanders J., Garcia-Marchan Y., Colina C., Lira R., Caldera A., Payares G., Sanoja C. 2006.** Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med. Chem.* **49**: 892-899.
- **Bompart, D., Núñez-Durán, J., Rodríguez, D., Kouznetsov, V., Meléndez, C., Sojo, F., y col. 2013.** Anti-leishmanial evaluation of C2-aryl quinolines: Mechanistic insight on bioenergetics and sterol biosynthetic pathway of *Leishmania braziliensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21 (2013) 4426–4431.
- **Brito, S., Crescente, O., Fernández, A., Coronado, A., Rodríguez, N. 2006.** Eficacia del ácido kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asteracea) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Bioméd.* **26**:180-87.
- **Calvay-Sánchez, K; Rojas-Palomino, N; Sandoval-Juarez, A; Cisneros-Tarmeño, A; Obregón-Cahuaya, C; Minaya-Gómez, G. 2015.** Capacidad infectiva de promastigotes en fase estacionaria de *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Viannia) peruviana*, en línea celular DH82. *Rev Perú MedExp Salud Pública.* **32(1)**:33-40.
- **Carbajo, E. 2013.** Efecto de Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas sobre la viabilidad de *Leishmania mexicana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- **Coa, J., Castrillón, W., Cardona, W., Carda, M., Ospina, V., Muñoz, J. 2015.** Synthesis, Leishmanicidal, Trypanocidal and Cytotoxic Activity of Quinoline-Hydrazone Hybrids. *Eur. J. Med. Chem.* doi: 10.1016/j.ejmech.2015.07.018.
- **Docampo, R., Jimenez, V., Lander, N., Li, Z., y Niyogi, S. 2013.** New Insights into the Roles of Acidocalcisomes and the Contractile Vacuole Complex in Osmoregulation in Protists. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2013 ; 305: . doi:10.1016/B978-0-12-407695-2.00002-0.

- **Figarella, K., Uzcategui, N., Zhou, Y., Lefurgey, A., Ouellette, M., Bhattecharjee, H. 2007.** Biochemical characterization of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1: possible role in volume regulation and osmotaxis. *Mol Microbiol* **65**(4),1006–1017 doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05845.x
- **Garrido, R. y Bonfante-Garrido, R., 2002.** Leishmaniasis in Venezuela. *J Paras Dis* 20: 69-73.
- **Ghorab, M., Ragab, F., Heiba, H., Nissan, Y y Ghorab, W. 2010.** Novel Brominated Quinoline and Pyrimidoquinoline Derivatives as Potential Cytotoxic Agents with Synergistic Effects of γ -Radiation. *Arch Pharm Res* **Vol. 35**, No 8, 1335-1346.
- **Huber, W. y Koella, J. 1993.** A comparison of three methods of estimating EC₅₀ in studies of drugs resistance in malaria parasites. *Acta Trop.* **55**:257-61.
- **Imbar, E., Schlisselberg, D., Suter Grotemeyer, M., Rentsch, D. y Zilberstein, D. 2013.** A versatile proline/alanine transporter in the unicellular pathogen *Leishmania donovani* regulates amino acid homoeostasis and osmotic stress responses. *Biochem. J.* (2013) **449**, 555–566 doi:10.1042/BJ20121262
- **Kouznetsov, V., Ochoa, C., Romero, A., Zacchino, S., Sortino, M., Gupta, M., Vázquez, Y y col. 2006.** A Straightforward Synthetic Approach to Antitumoral Pyridinyl Substituted 7*H*-Indeno[2,1-*c*]Quinoline Derivatives Via Three-Component Imino Diels-Alder Reaction. *Letters in Organic Chemistry* **3**, 300-304.
- **Kouznetsov, V., Robles-Castellano, M., Sojo, F., Rojas-Ruiz, Fernando., Arvelo. 2017.** Diverse C-6 substituted 4-methyl-2-(2-, 3- and 4-pyridinyl)quinolines: synthesis, in vitro anticancer evaluation and in silico studies. *Med Chem Res* DOI 10.1007/s00044-016-1775-8
- **López-Carvajal, L. 2016.** Sistematización de Estudios Clínicos Sobre la Eficacia de Tratamientos para la Leishmaniasis Cutánea 1980-2015. *archivos de medicina issn 1698-9465.* **Vol. 12** No. 3: 8 doi: 10.3823/1307.
- **Mandal, G., Mandal, S., Sharma, M., Charret, K., Papadopoulou, D., Bhattacharjee, H. 2015.** Species-Specific Antimonial Sensitivity in *Leishmania* Is Driven by Post-Transcriptional Regulation of AQP1. *PLoS Negl Trop Dis* 9(2): e0003500. doi:10.1371/journal.pntd.0003500.
- **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.

- **Mesa, A., Molano, A., Seon, B., Figadere, B., Robledo, S., Muñoz, D. y Sáez, J. 2008.** Síntesis y Actividades Leishmanicida y Citotóxica *in vitro* de Análogos 2-arilquinolinas. *VITAE*. Vol. 15 número 2. 259-266
- **Núñez, J., Bompert, D., Charris, J., Camacho, J., Rodríguez, D., Rodríguez, D. 2012.** Efectos deletereos del JC25 sobre la bioenergética celular y la biosíntesis de esteroides de *Leishmania braziliensis*. Revista Facultad de Farmacia • Vol. 75 • Nº 2 • 50–58.
- **Orué, A., Pérez, J., Fuentes, J., Odremán, I., Serrano-Martín, X. y Mendoza-León, A. 2006.** *Leishmania sp.*: Efecto de la Glibenclamida, un bloqueador de canales de K^+_{ATP} , sobre el ciclo de vida *in vitro*. *SALUS*. Vol. 11, Supl. Nº 1
- **Pérez, V. 2013.** Nuevos piridofanos simétricos con actividad antiproliferativa y leishmanicida. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica. Granada-España.
- **Rholoff, P y Docampo, R. 2008.** A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol. NIH Public Access*, 118(1): 17–24.
- **Schoijet, A., Miranda, K., Girard-Dias, W., De Souza, W., Flawiá, M., Torres, H., Docampo, R., Alonso, G., 2008.** A *Trypanosoma cruzi* Phosphatidylinositol 3-kinase (TcVps34) Is Involved in Osmoregulation and Receptor-mediated Endocytosis. *Jour. Biol. Chem.*, 283:31541 – 31550.
- **Serrano-Martín, X., Payares, G. y Mendoza-León, A. 2006.** Glibenclamida. A blocker of K^+_{ATP} channels shows anti-leishmanial activity in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4:72-76.
- **Serrano-Martín, X. 2010.** Quimioterapia contra la leishmaniasis: estado del arte, retos y nuevas propuestas desde Venezuela. *Redalyc*. Vol. 2, núm. 1, enero-junio, pp. 69-75.
- **Serrano-Martín, X. 2012.** Un enfoque soberano y nacionalista, para combatir las parasitosis tropicales olvidadas por transnacionales farmacéuticas. Consideraciones Teóricas – Políticas para la Ciencia y Tecnología en la Republica Bolivariana Venezolana.

Recursos electrónicos:

- <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> (consultado, 1 Agosto 2016)
- <https://www.ovsalud.org/publicaciones/documentos-oficiales/> (consultado, 1 Agosto 2016)
- <http://www.iqb.es/diccio/m/mi3.htm> (consultado, 13 Septiembre 2016)