



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Efecto de Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas sobre
la viabilidad de *Leishmania mexicana*.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por la Bachiller **Erika Rosario
Carbajo Veramendi** como requisito
parcial para optar al título de
Licenciada en Biología

Tutora: Dra. Concepción Hernández

CARACAS, VENEZUELA

FEBRERO 2013

*A los estudiantes que todos los años cruzan los muros de la facultad
con la ilusión de hacer realidad sus sueños
(ya sea dentro o fuera de su recinto)*

Agradecimientos

En primera instancia, por mi estricta formación católica y porque mi fe así lo dicta, a Dios y a la Virgen del Rosario de Yauca, por su misericordiosa protección.

A mis Padres por su apoyo incondicional y ser esa fuerza motivadora, soy lo que soy y he llegado hasta aquí por ustedes.

A los integrantes del Laboratorio de Fisiología de Membranas y a mi Tutora la Dra. Concepción Hernández, por abrirme las puertas de su laboratorio y ofrecerme su constante apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Prof. Francisco Arvelo y a Felipe Sojo por la colaboración que prestaron durante la fase experimental.

A todos mis amigos de la universidad en especial a Aixa, Indira, Yeifre, Eleiribeth, Alex, Javi, Mandy y Gaby. Sin ustedes los tiempos de pasillo hubieran sido muy aburridos. Gracias por su apoyo, sin duda su amistad es un gran tesoro.

A mis “compañeritas de laboratorio”, Mavi, Lali, Ely, Michi, Jenni y Ale. Ustedes me agradecen mis apuntes y mi orden, yo les agradeceré siempre su capacidad de convertir las prácticas en momentos divertidos que recordare por siempre.

A Isaac Gómez, Dios sabía que necesitaba un apoyo cuando la familia y los amigos no estuvieran. Por ti no me arrepiento de haber cruzado las puertas de la facultad.

A la Prof. Laurin y el Prof. Jesús Romero, por sus valiosos consejos académicos.

A la ilustre Universidad Central de Venezuela por ofrecer un espacio propicio para mi desarrollo profesional, académico y personal.

Resumen

Al género *Leishmania* pertenece un grupo de parásitos intracelulares responsables de la leishmaniasis, enfermedad que afecta alrededor de 12 millones de personas en el mundo. Los tratamientos disponibles para la enfermedad, son poco efectivos ya que generan resistencia por parte del parásito y provocan fuertes efectos secundarios. Actualmente se buscan alternativas terapéuticas más eficientes y menos tóxicas para el tratamiento de la enfermedad.

Se ha reportado el efecto anti-leishmania de drogas basadas en la estructura de las quinolinas. A este grupo pertenecen las Tetrahydroquinolinas, compuestos naturales y sintéticos con una amplia gama de actividades biológicas. Sus análogos policíclicos, las indenoquinolinas, se han propuesto como fármacos potenciales, lo cual hace interesante evaluar su efecto sobre *Leishmania* con la finalidad de encontrar nuevos compuestos utilizables en el tratamiento de la leishmaniasis.

En este trabajo se evaluó el efecto de Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas sobre *Leishmania mexicana*. Ensayos de citotoxicidad mediante el método de MTT sobre la forma promastigote, revelaron una actividad citotóxica con valores de IC_{50} de 0,2 a 31,8 μ g/ml, siendo los compuestos 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). Ensayos sobre la viabilidad celular de los promastigotes muestran que el efecto citotóxico de CRIS 110, AR1 y AR65 permanece luego de 72 horas de tratamiento, mientras que para el resto de los compuestos el efecto se revierte luego de 48 horas. Estudios de microscopia de fluorescencia con naranja de acridina revelaron cambios en la morfología celular. Es frecuente observar la presencia de células multinucleadas o multiflageladas y detenidas en la citoquinesis. Mediante Rodamina-123 se evidenció disrupción del potencial transmembrana mitocondrial, sugiriendo que estos compuestos ejercen un efecto inductor de la apoptosis. Además, ensayos de citotoxicidad con macrófagos murinos J774 muestran que a las IC_{50} encontradas para los promastigotes no hay un efecto significativo sobre los macrófagos, demostrando el efecto selectivo de los compuestos hacia el parásito. Los resultados permitieron escoger a CRIS 110, AR 1 y AR 65 como los compuestos más activos. Con estos tres compuestos se realizaron combinaciones y se evaluó el

efecto de las mismas sobre promastigotes. Las combinaciones realizadas con AR1 fueron sinérgicas. El mismo ensayo se realizó combinando dichos compuestos con Miltefosina resultando ser combinaciones antagónicas.

Se evaluó el efecto de CRIS 110, AR 1 y AR 65 sobre la forma intracelular del parásito, dando como resultado una inhibición en la proliferación de los amastigotes dentro del macrófago durante las 72 horas de tratamiento.

Los resultados permiten proponer a estos tres compuestos como futuros candidatos para continuar evaluando su potencial aplicación como agentes terapéuticos contra la leishmaniasis.

Contenido

1. Introducción	1
1.1 Género <i>Leishmania</i>	2
1.2 Ciclo de vida	3
1.3 Terapias contra la leishmaniasis	6
1.4 Mecanismos de resistencia	11
1.5 Blancos terapéuticos (dianas quimioterapéuticas)	12
1.6 Sinergismo	15
1.7 Quinolinas y derivados	16
2. Objetivos	20
2.1 Objetivo General	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3. Materiales y Métodos	21
3.1 Cultivo de parásitos	21
3.2 Cultivo de macrófagos	21
3.3 Contaje celular	22
3.4 Preparación de las drogas e indenoquinolinas	22
3.5 Evaluación de la actividad leishmanicida de las indeno quinolinas	23
3.6 Evaluación del efecto sobre la viabilidad celular de los promastigotes en el tiempo	26

3.7	<i>Evaluación del efecto sobre la morfología de los promastigotes</i>	26
3.8	<i>Evaluación del efecto sobre el potencial trans-membrana mitocondrial.</i>	27
3.9	<i>Estudios de sinergismo sobre promastigotes</i>	28
3.10	<i>Evaluación del efecto de las Indeno quinolinas sobre macrófagos de la línea celular J774.</i>	30
3.11	<i>Evaluación del efecto sobre amastigotes intracelulares.</i>	30
4.	Resultados y Discusión	32
4.1	<i>Actividad leishmanicida de las indeno quinolinas</i>	32
4.2	<i>Efecto de las indeno quinolinas sobre la morfología de los promastigotes</i>	38
4.3	<i>Efecto de las indeno quinolinas sobre el $\Delta\Psi_M$ de los promastigotes</i>	40
4.4	<i>Estudio del sinergismo entre las indeno quinolinas y miltefosina sobre promastigotes.</i>	44
4.5	<i>Efecto de las indeno quinolinas sobre MΦ m$\acute{u}$ridos de la línea J774</i>	46
4.6	<i>Efecto de las indeno quinolinas sobre amastigotes.</i>	47
5.	Conclusiones.	49
6.	Anexo	51
7.	Bibliografía	52

1. Introducción

La leishmaniasis es una de las enfermedades parasitarias más prevalentes en el mundo. Es causada por organismos del género *Leishmania*, grupo de parásitos intracelulares del reino Protista, subreino Protozoa, orden Kinetoplastida familia *Trypanosomatidae*, que infectan y se reproducen principalmente en los macrófagos de animales vertebrados. La enfermedad es transmitida por insectos dípteros hematófagos, que corresponden a diferentes especies de los géneros *Phlebotomus* o *Lutzomya*. El reservorio natural está constituido por animales vertebrados.

La leishmaniasis está presente en 88 países de las regiones tropicales y subtropicales de América, Europa, Asia y África y afecta principalmente la población de las áreas rurales y semiurbanas donde prevalece la pobreza y donde los sistemas de salud son poco eficientes. Se calcula que aproximadamente 350 millones de personas están en riesgo de adquirir la infección, 12 millones de personas sufren la enfermedad y la incidencia anual es de 2 a 3 millones de casos nuevos (Murray y col, 2005). Actualmente se reconoce a este parásito como patógeno oportunista en personas inmunodeprimidas, incluyendo aquellos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana tipo-1 (VIH-1). Además, la leishmaniasis y el SIDA se solapan en varias regiones sub-tropicales y tropicales de todo el mundo, incluyendo la zona del Mediterráneo (Olivier y col, 2003), por lo que desde el año 2002 ha sido clasificada por la Organización Mundial de la Salud como enfermedad emergente o no controlada para la cual no se dispone de vacuna.

En Venezuela, las infecciones por *Leishmania* han sido reportadas en todas las entidades federales, siendo las más importantes los estados Trujillo y Mérida, con tasas superiores a 30 casos por 100.000 habitantes. También se han reportado casos en todas las edades, con predominio en el grupo de 15 a 24 años, y los más expuestos a padecer la enfermedad son del género masculino y personas del sector agropecuario (De Lima y col, 2010).

1.1 Género *Leishmania*

Cinco grandes especies del género *Leishmania* (*L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. donovani*) son las causantes de las tres principales formas de la enfermedad en los seres humanos: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral. La *L. mexicana*, *L. tropica* y *L. major* causan la leishmaniasis cutánea que consiste en úlceras cutáneas que se localizan normalmente en el sitio inicial de la picadura del insecto. Cuando la lesión se caracteriza por la presencia de nódulos no ulcerados, ricos en parásitos y a menudo diseminados por toda la superficie cutánea, debido a la falta de respuesta inmune mediada por células (permitiendo la reproducción descontrolada de los parásitos) se habla de leishmaniasis cutánea difusa, producida por *L. amazonensis* y *L. mexicana* en América (Zerpa y Convit, 2009). La leishmaniasis mucocutánea es causada generalmente por *L. braziliensis*, la primera lesión ocurre en el sitio inicial de la picadura del insecto transmisor, pero la infección también compromete el sistema mucoso de la cavidad nasal y bucal, provocando la degeneración de los tejidos suaves y cartilaginosos. La leishmaniasis visceral es predominantemente causada por *L. donovani* y *L.*

infantum, los síntomas incluyen un lento desarrollo de fiebre de bajo grado, malestar general, anemia y profusión del abdomen, debido al agrandamiento del hígado y el bazo. Los signos clínicos incluyen edema, especialmente de la cara, sangrado de las membranas mucosas, dificultades respiratorias y diarrea (Cunningham, 2002).

Según De Lima y colaboradores (2010) las formas clínicas con mayor prevalencia reportadas en Venezuela son la leishmaniasis cutánea localizada (97,94%), leishmaniasis mucocutánea (1,11%) y leishmaniasis cutánea difusa (0,22%). La Leishmaniasis visceral es considerada hasta ahora, rara dentro de los países andinos (Colombia, Perú, Bolivia, Venezuela y Ecuador) (Davies y col, 2000). Sin embargo en Venezuela se ha reportado un incremento de esta forma de la enfermedad en el estado Nueva Esparta (Rodriguez y col, 2005)

1.2 Ciclo de vida

Leishmania se presenta bajo dos formas morfológicas diferentes (Figura 1), como promastigote móvil y flagelado, alargado, de 10 a 14 μm de longitud, comúnmente encontrado en el vector invertebrado del genero *Phlebotomus* o *Lutzomya* y como amastigote, inmóvil, intracelular, de forma redondeada u ovoide, de 2,5 a 5,0 μm de diámetro, encontrada en el hospedador vertebrado (Cunningham, 2002).

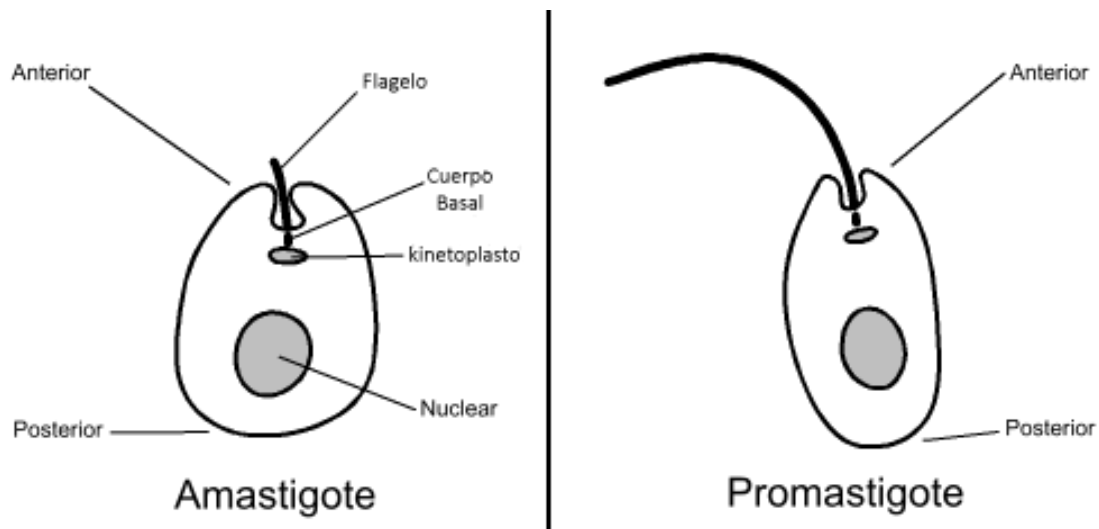


Figura 1 Formas celulares de *Leishmania*. Izquierda: Forma intracelular (amastigote). Derecha: Forma extracelular móvil (promastigote). (Modificado de <http://www.richardwheeler.net/contentpages/index.php>)

El ciclo biológico del parásito (Ver figura 2) empieza cuando el vector invertebrado al alimentarse, toma sangre de un vertebrado infectado e ingiere macrófagos infectados con amastigotes presentes en su piel. Los amastigotes se liberan en el intestino medio del insecto, donde se diferencian en promastigotes flagelados procíclicos (forma no infectiva). Se multiplican activamente por división binaria longitudinal. Algunos quedan libres desde el inicio en el lumen intestinal; otros se adhieren al epitelio del intestino. Mientras se encuentran aquí, los promastigotes pasan por un proceso llamado metaciclogénesis en donde se transforman en promastigotes metacíclicos altamente infectivos capaces de sobrevivir en el hospedero vertebrado (Muskus y Marín, 2002). Este proceso se asocia a cambios morfológicos pasando por diferentes etapas: promastigotes nectomónadas, haptomónadas, paramastigotes y, finalmente, promastigotes metacíclicos siendo estos últimos más pequeños, delgados y con un flagelo más

largo (De Gopegui y Ruiz, 2003). Después de la replicación y diferenciación en el intestino, los promastigotes migran a las piezas bucales del insecto vector.

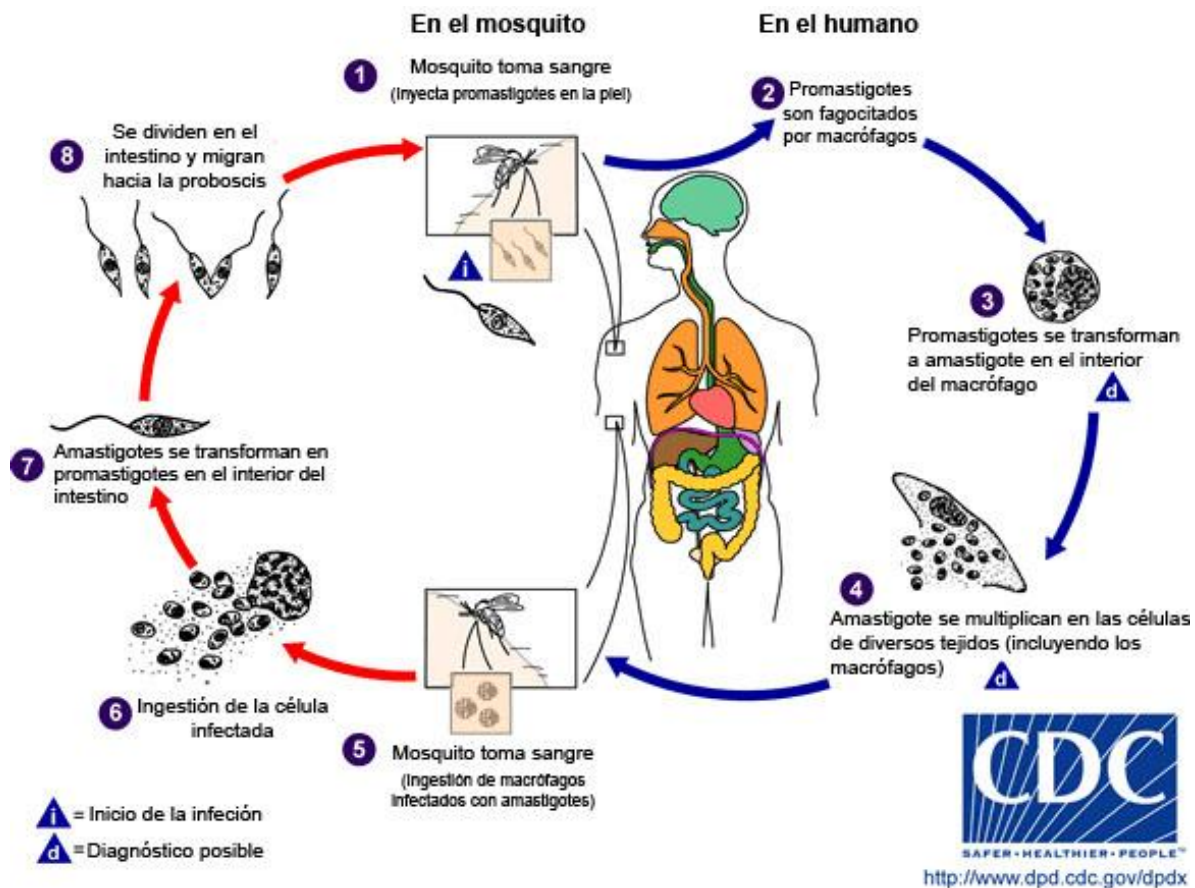


Figura 2. Ciclo vital de *Leishmania*.

(Modificado de http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.htm)

En la próxima alimentación el insecto infectado inoculará en la dermis del hospedador vertebrado los promastigotes metacíclicos presentes en la proboscis (Magill, 1995). La saliva del mosquito tiene un rol en el establecimiento de la infección, debido a que reduce la producción del óxido nítrico por los macrófagos activados. Los promastigotes permanecen en el espacio intercelular e inician la acumulación de neutrófilos y macrófagos (Hall y Titus 1995). Aunque muchos promastigotes son destruidos por los leucocitos polimorfonucleares, unos pocos

llegan a infectar a los macrófagos. Sobre la superficie de *Leishmania* han sido identificados numerosos receptores que intervienen en el proceso de infección, entre los más importantes están la glicoproteína 63 (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG), que son usados por los parásitos para adherirse a los macrófagos (Tremblay y col, 1996). Una vez adentro, se transforman en amastigotes y luego desarrollan mecanismos de resistencia a la actividad digestiva y antimicrobiana de las células fagocíticas (Hall y Joiner, 1991). Los amastigotes empiezan a reproducirse por fisión binaria dentro de vacuolas parasitóforas de los macrófagos y eventualmente salen para infectar nuevas células del sistema fagocitario mononuclear, donde se multiplican de nuevo. El ciclo se reanuda cuando el flebótomo pica a un hospedador para alimentarse de sangre.

1.3 Terapias contra la leishmaniasis

Numerosos medicamentos han sido propuestos, ensayados o son corrientemente utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis, la larga lista de productos comprende diversas categorías químicas: arsenicales, antimoniales pentavalentes, nivaquina, quinacrina, dehidroemetina, metronidazol, pamoato de cicloguanil (camolar), anfotericina B, Rifampicina, Estreptomicina, isoniacida, aureomicina, Sulfas (cotrimoxazol), Ketoconazol, Itraconazol, Penicilina, Aminosidina, etc. (Mollinedo, 2002)

Tradicionalmente el tratamiento de la enfermedad incluye dos líneas de elección. La primera es un tratamiento sistémico consistente en la administración intramuscular de fármacos basados en Antimoniales pentavalente (antimoniato de

meeglumina o *Glucantime* y estibogluconato de sodio o *Pentostam*) (Figura 3) durante un plazo de 20 a 30 días. Los antimoniales pentavalentes administrados al paciente se convierten en trivalentes en el interior de los macrófagos. Su mecanismo de acción frente a *Leishmania* no se conoce completamente. Se piensa que actúan sobre el metabolismo energético inhibiendo las enzimas fosfofructoquinasa y piruvato dehidrogenasa, bloqueando la formación de ATP y GTP. Esta menor cantidad de nucleótidos trifosfato favorece la disminución de la síntesis de macromoléculas, lo cual contribuye a la baja viabilidad de los parásitos expuestos a estos compuestos (Berman y col, 1985). Sin embargo los tratamientos con antimoniales pentavalentes son potencialmente tóxicos lo que dificulta la adherencia del paciente al tratamiento y con frecuencia ineficaces, en vista de que numerosos reportes muestran una reincidencia de la enfermedad, producto de la aparición de cepas resistentes al fármaco (Croft y col, 2006). Entre los efectos adversos se incluyen debilidad, anorexia, mialgias, artralgias, inapetencia, náuseas, vómitos, plenitud gástrica, epigastralgia, cefalea, mareos, palpitaciones, prurito y cardiotoxicidad, especialmente asociada a dosis altas y tiempo prolongado.

La segunda línea de compuestos utilizados en casos de fracaso terapéutico con sales antimoniales pentavalentes o cuando hay contraindicación médica para el uso de antimoniales, por lo general incluye la pentamidina y la anfotericina B, que pueden ser muy tóxicos (Hepburn y col, 1994; Berman, 1996; Croft y col, 1997). La anfotericina B (Figura 3) es útil en las formas clínicas de leishmaniasis mucosa y visceral. Según Aparicio y colaboradores (2003) es un antibiótico

macrólido poliénico que altera la permeabilidad de la membrana citoplasmática fijándose al ergosterol de la membrana de *Leishmania*, en la que forma poros que permiten el paso de iones (sobre todo potasio) y otras moléculas que llevan a la muerte celular. Los mismos autores mencionan también que hay un proceso oxidativo que contribuye al daño ocasionado sobre el parásito. En general se aplica en su forma liposómica, que resulta menos tóxica. Como efectos secundarios se incluyen afecciones renales, malestar general y dolor en el sitio de administración del fármaco. Además, dado que posee propiedades teratogénicas no puede ser administrado durante el embarazo ni en el período de lactancia. La Pentamidina (Figura 3) es una diamidina con un amplio espectro de actividad antiparasitaria ya que es efectiva contra la leishmaniasis, tripanosomiasis y pneumocistosis. Su mecanismo de acción no está claramente definido; puede interferir con la incorporación de nucleótidos en los ácidos nucleicos (RNA y DNA). Un estudio indica que la pentamidina interacciona con el ADN del kinetoplasto formando complejos que en consecuencia alteran la función biológica de la mitocondria, ocasionando la muerte celular del parásito (Wilson y col, 2008). Entre las reacciones adversas de la pentamidina las más frecuentes son: dolor, induración y abscesos estériles en el sitio de aplicación, además de náuseas, vómitos, mareos, adinamia, mialgia, cefalea, hipotensión, lipotimias y síncope. La pentamidina está contraindicada para gestantes, personas con diabetes, insuficiencia renal, insuficiencia hepática y enfermedades cardíacas (Balaña-Fouce y col, 1998).

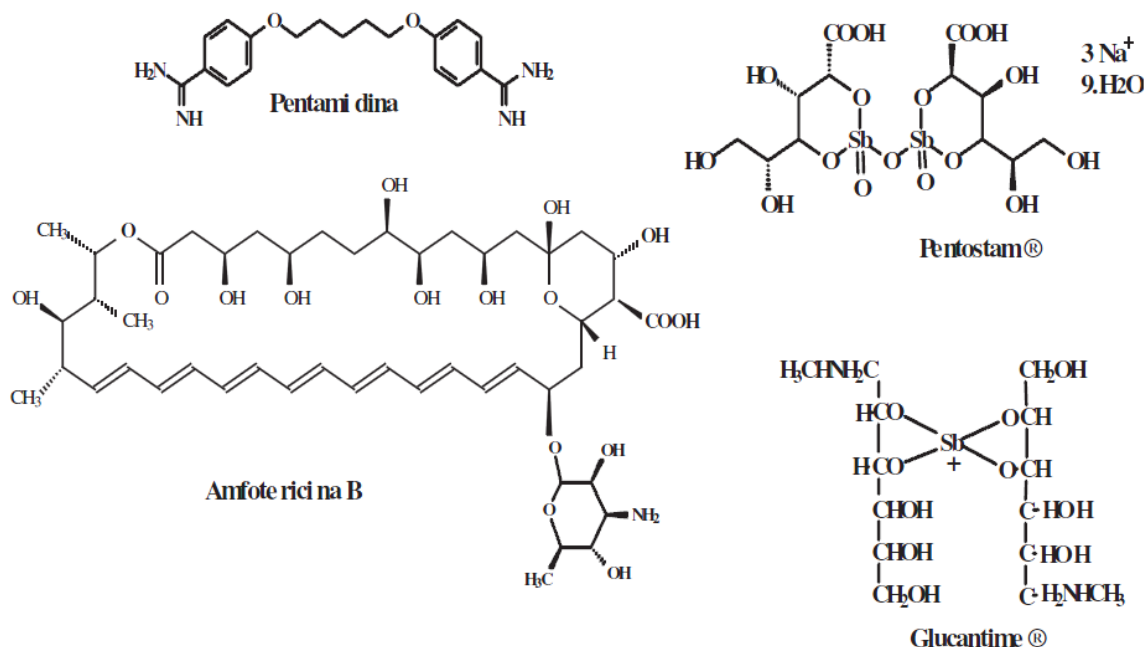


Figura 3 Medicamentos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis (Tomado de Mesa y col., 2008).

Recientemente un tratamiento alternativo incluye la hexadecilfosfocolina o mejor conocida como miltefosina (Figura 4), primer fármaco oral para el tratamiento de la leishmaniasis visceral, que cura un 95% de los casos ya que presenta una potente actividad leishmanicida. Aunque el mecanismo de acción de la miltefosina es poco conocido, se piensa que interviene en el metabolismo de los lípidos, en la biosíntesis del glicosilfosfatidilinositol, en la remodelación éter-lipídica (a través de la inhibición de una acil-CoA-aciltransferasa-alquil específica) (Paris y col, 2004) y en la inhibición de la síntesis de novo de la fosfatidilcolina a nivel de la fosfatidil-etanolamina N-metil-transferasa. Esto conduce a un proceso apoptótico de una manera eficiente y selectiva (Welburn y col, 1999). Probablemente sea la droga más económica que se utiliza en la actualidad y la más sencilla de administrar. Su administración oral obvia la necesidad de hospitalización y reduce

las incomodidades de las inyecciones lo que puede mejorar la adherencia de los pacientes al tratamiento. Adicionalmente favorece al paciente al no tener que interrumpir sus actividades laborales para asistir diariamente a la aplicación del producto inyectable y al eliminarse uno de los efectos secundarios más frecuentes e incapacitantes: el dolor y la inflamación en el sitio de la inyección cuando se administra la quimioterapia por vía intramuscular. Como efectos secundarios se ha reportado que el 35% al 60% de los pacientes presentan reacciones adversas gastrointestinales leves y 10% al 20% presentan elevación leve de transaminasas y creatinina, efectos que desaparecen al suspender el tratamiento, por lo que es una droga bien tolerada (Soto y Soto, 2006). Sin embargo, la miltefosina es teratogénica e induce abortos en animales por lo que debe manejarse de una manera controlada asegurando que las mujeres que reciben el tratamiento acepten y sigan las medidas apropiadas necesarias para evitar el embarazo durante el tratamiento y hasta 2 a 3 meses después de recibir la última cápsula (Vélez y col., 2010). La miltefosina tiene una vida media larga, (de aproximadamente siete días) y es detectable en plasma hasta 5 meses después de finalizado el tratamiento, lo cual favorece la selección de cepas resistentes. Para evitar abusos y tratamientos incompletos debe administrarse bajo supervisión directa del personal de salud, ya que los pacientes apenas sienten mejoría suspenden el tratamiento, comparten el tratamiento con familiares o conocidos, o simplemente venden parte del medicamento entregado. Por último, existe una variabilidad de respuesta a la miltefosina por parte de las distintas especies de *Leishmania* y distintas sensibilidades en las especies mantenidas en el laboratorio. Un estudio realizado por Vélez y colaboradores (2010) muestra un potencial

limitado para el tratamiento de Leishmaniasis cutánea en Colombia, con una tasa de curación del 69,8%. En base a este resultado este medicamento no se recomienda como tratamiento de primera elección de la Leishmaniasis cutánea. No así para la leishmaniasis mucocutánea, ya que el mismo trabajo demuestra que la miltefosina es eficaz en el tratamiento de los casos de Leishmaniasis mucocutánea que no responden al tratamiento con antimoniales y los casos de Leishmaniasis cutánea difusa.

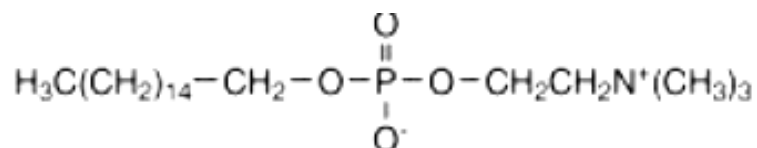


Figura 4 Estructura de la Miltefosina, originalmente desarrollado como fármaco antitumoral, actualmente se usa como tratamiento de la leishmaniasis visceral (Croft y col, 2005).

1.4 Mecanismos de resistencia

Uno de los principales problemas en la quimioterapia actual contra la leishmaniasis es el desarrollo de resistencia por parte del parásito. La resistencia a fármacos es definida como la disminución de la eficacia de compuestos en una población que previamente era susceptible a los mismos. En *Leishmania* existen al menos tres mecanismos celulares asociados a la expresión de quimio-resistencia: amplificación de los genes de la enzima blanco del fármaco (Beverley y col, 1984); cambios estructurales y funcionales de las enzimas blanco de las drogas (Chen y col, 1987) y disminución de los niveles intracelulares de la droga a través de transportadores específicos (Ellenberger y Beverley, 1989), concretamente los transportadores ABC (por ATP binding cassette), los cuales utilizan energía de la hidrólisis del ATP para disminuir los niveles citoplasmáticos de las drogas. El

miembro que ha sido más estudiado, perteneciente a esta familia de transportadores es la glicoproteína P (P-glicoprotein, P-gp, o MDR por las siglas en inglés, Multi Drug Resistance), ya que está asociado a la quimio-resistencia (Borst y Ouellette, 1995). Se ha encontrado que una serie de parámetros fisiológicos se modifican en las cepas quimioresistentes de *Leishmania major*. A nivel de la membrana se ha encontrado la disminución de la expresión de la enzima fosfatasa ácida, del marcador de metaciclologénesis meta-1 y de los lipofosfoglicanos de superficie, así como también la incorporación de folato y nucleósidos. A nivel intracelular se ha descrito un aumento de la fosforilación de tubulina, de los niveles de pterina y tripanotio y de la actividad de dihidrofolato reductasa y timidilato sintetasa (Ponte Sucre, 2003). Estos cambios sugieren la modificación de la fisiología del parásito durante la adquisición de la resistencia.

1.5 Blancos terapéuticos (dianas quimioterapéuticas)

En el campo de la quimioterapia, se han seguido dos vertientes a fin de encontrar nuevas moléculas para el tratamiento de enfermedades: el método empírico y el método racional. El método empírico fue creado y aplicado por P. Ehrlich, el fundador de la quimioterapia. Consiste en ensayar un gran número de moléculas orgánicas sobre el agente patógeno. Este método es complejo y costoso, pues requiere ensayar las presuntas moléculas activas en gran número de animales de experimentación (ratas, ratones, monos, etc.). Por otra parte, requiere la síntesis y/o el ensayo de muchas moléculas orgánicas para reconocer a la más activa. Debido a esto surgió el método racional, el cual consiste en identificar un blanco molecular en el organismo patógeno que esté implicado en

una función esencial para ese organismo. Ese blanco puede ser una macromolécula (DNA, RNA), una enzima o un receptor (Stoppani, 1999). Los nuevos medicamentos antileishmania son necesarios y el enfoque adoptado por muchos para lograr este objetivo es el método racional. Los estudios comienzan con la identificación de los posibles blancos farmacológicos (ya sea a través de estudios bioquímicos o cada vez más frecuentemente, el uso de las bases de datos del genoma de *Leishmania*) los cuales deben ser lo suficientemente diferentes del hospedador para permitir su inhibición selectiva en el parásito. Luego la validación de los blancos, ya sea química o genéticamente y por último la identificación de inhibidores que pueden servir como compuestos potenciales para entrar en el proceso de desarrollo de fármacos.

La validación de blancos terapéuticos es un proceso importante, existen dos enfoques que pueden ser clasificados como "métodos químicos" y "métodos genéticos". La validación química implica el uso de medicamentos o compuestos experimentales para evidenciar que la inhibición específica del blanco da como resultado la inhibición del crecimiento o la muerte del parásito. La validación genética incluye herramientas genéticas que permiten modular los niveles deseados de sobreexpresión o subexpresión del blanco. Una subexpresión del blanco conduce a disminución de la sensibilidad al fármaco en las células intactas, por el contrario, la sobreexpresión del blanco puede llevar a la hipersensibilidad. La capacidad de obtener organismos viables en los que la expresión de un blanco está completamente suprimida es sugerente de que el blanco no es esencial para el crecimiento o la supervivencia y por lo tanto probablemente no sea una diana terapéutica apropiada (Frearson y col, 2007).

Los blancos para *Leishmania* generalmente más estudiados y aceptados como posibles dianas terapéuticas validas se describen a continuación.

En primer lugar se encuentra el ergosterol, componente encontrado en la membrana celular de *Leishmania* el cual permite el crecimiento, la división celular, y da fluidez e integridad a la membrana plasmática. La presencia de ergosterol en la membrana del parásito, junto con su ausencia en las membranas de las células del mamífero hospedador convierte al ergosterol en un blanco para el desarrollo de inhibidores de su biosíntesis (Roberts y col, 2003). Otro blanco lo constituyen las cisteín-proteasas. Las especies de *Leishmania* particularmente *L. mexicana* y *L. major*, contienen un nivel alto de cisteín proteasas que son requeridas para la multiplicación y sobrevivencia del parásito (mecanismos de evasión de la respuesta inmune, la inmunomodulación y nutrición) Las enzimas más representativas de este grupo son la catepsina L y la catepsina B, las cuales se encuentran en organelos lisosomales del parásito (Kouznetsov y Melendez, 2009). La importancia de inhibir estas enzimas radica en el hecho de que en el humano existen isoformas insensibles a compuestos que afectan las cisteín proteasas de *Leishmania* (Muñoz y col, 2006). Dada su importancia para el parásito, se investigan péptidos inhibidores de diversas cisteín-proteasas (Ponte-Sucre y col, 2006, 2007).

Otra atractiva diana terapéutica es la tripanotión reductasa, flavoproteína dependiente de NADPH, validada en la quimioterapia de infecciones por tripanosomátidos (*Trypanosoma* y *Leishmania*). Esta enzima se encarga de mantener los niveles de tripanotion reducido, compuesto que ayuda al parásito a desprenderse de las sustancias tóxicas derivadas del oxígeno (peróxido de

hidrogeno y otros peróxidos intracelulares) consumido durante su respiración. Sólo se encuentra en estos parásitos y no está presente en humanos por lo que, también se estudian inhibidores que afecten de la síntesis del tripanotión (Heby y col, 2007).

1.6 Sinergismo

Según Murray (2001), en la última década las actividades experimentales para identificar nuevos tratamientos antileishmania están dirigidas, entre otras acciones, a la búsqueda de una mejor sinergia, tipo de interacción que da lugar al aumento del efecto de uno o de dos fármacos aplicados conjuntamente. Se hace referencia a una sinergia de suma cuando el efecto final es aproximadamente igual a la suma de los efectos individuales de ambos fármacos. En caso de que el efecto final sea mucho mayor del esperado por esta suma, se trata de una sinergia de potenciación. Este último concepto es el reconocido por la mayoría de los autores, aunque otros reservan el término de sinergia sólo para cuando existe potenciación. Así, se aplica el término de efecto aditivo a la sinergia de suma, mientras que el término de efecto sinérgico se aplica a la sinergia de potenciación. El concepto contrario a la sinergia es el antagonismo. Dos fármacos son antagonistas cuando la interacción da lugar a una disminución de los efectos de uno o ambos fármacos. De aquí se deduce la importancia del sinergismo en el tratamiento de enfermedades ya que permiten conseguir un mejor efecto terapéutico con la disminución de la cantidad administrada de algún medicamento comercial, disminuyendo así sus efectos secundarios, o descubriendo una disminución de la disponibilidad del medicamento, producto de otros tratamientos

ajenos a la enfermedad. Para el caso de *Leishmania* los estudios de sinergia entre los fármacos comerciales ofrecen como ventaja la acción sobre múltiples blancos disminuyendo la adquisición de resistencia por parte del parásito. Estudios realizados por Seifert y Croft (2006) combinando miltefosina con anfotericina B, estibogluconato sódico o paromomicina, en *L.donovani*, muestran que in vitro la interacción entre estas drogas es indiferente, mientras que in vivo (usando ratones BALB/c) se observa una potenciación de la actividad contra *Leishmania* combinando miltefosina con paromicina o con anfotericina B.

1.7 Quinolinas y derivados

Las quinolinas son compuestos de bajo peso molecular, formados por la unión de un núcleo derivado del benceno y otro piridínico. Son fácilmente solubles en disolventes orgánicos y se utilizan ampliamente en la medicina ya que muestran una gran gama de propiedades antisépticas y antibióticas. El núcleo quinolínico se encuentra en muchos agentes farmacológicamente activos como antimaláricos, antibacteriales, antiinflamatorios, antiasmáticos, antihipertensivos, y antitrypanosoma, entre otros (Kouznetsov y col, 2007).

Numerosos reportes demuestran el efecto antiparasitario de varias drogas basadas en la estructura de las quinolinas, las cuales presentan actividad *in vitro* contra agentes causales de leishmaniasis cutánea, leishmaniasis visceral, tripanosomiasis africana, enfermedad de Chagas y contra el virus linfotrópico humano tipo 1 (HTLV-1). Mesa y colaboradores (2008) evaluaron la actividad leishmanicida de 2-esterilquinolinas (Figura 5A) derivadas de *Galipea longiflora* sobre amastigotes axénicos, encontrando concentraciones inhibitorias medias

(IC₅₀) entre 1,4 y 19,1 µg/ml. La sitamaquina, una 8-amino-quinolina que se encuentra en fase preclínica de estudio (Figura 5B), induce alteraciones estructurales en *L. tropica*, un rápido colapso del potencial de la membrana mitocondrial interna de promastigotes de *L. donovani* (Vercesi y Docampo, 1992) y la alcalinización de ácidocalcisomas en esta misma especie (Vercesi y col 2000). Por otra parte Tempone y colaboradores (2005) ensayaron quinolinas 3-sustituídas (cuya estructura general se muestra en la Figura 5C) sobre promastigotes de *L. chagasi*. Esta quinolina indujo daños en las mitocondrias (hinchamiento y reducción en el número de crestas), formación de gránulos y vacuolas en el citoplasma de promastigotes y una actividad selectiva hacia la forma amastigote con un IC₅₀ de 3,55 µg/ml.

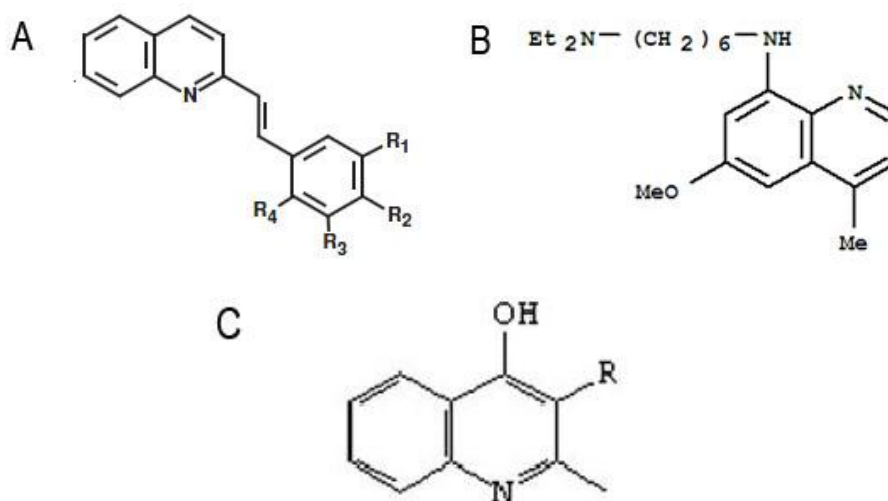


Figura 5 Estructura general de quinolinas con efecto antiparasitario. **A.** 2-esterilquinolinas (Tomado de Mesa. y col., 2008) **B.** sitamaquina (8-amino-quinolina) (Tomado de <http://www.lookchem.com/cas-533/5330-29-0.html>), **C.** quinolina 3-sustituída (Tomado de Tempone y col., 2005)

Entre los derivados que se basan en la estructura de las quinolinas se encuentra las Tetrahydroquinolinas que son una clase importante de compuestos naturales y sintéticos que han mostrado una amplia gama de actividades biológicas. Kouznetsov y colaboradores (2007) ensayaron estos compuestos sobre amastigotes de *L. chagasi* encontrando una actividad citotóxica con $IC_{50} > 6 \mu\text{g/ml}$. Dentro del grupo de las Tetrahydroquinolinas se incluyen a las indeno [2,1-c] quinolinas, estructuras interesantes debido a su recientemente descubierta actividad antitumoral. Por ejemplo, la 6 - [[2 (dimetilamino) etil] amino]-3-hidroxi-7H-indeno [2,1-c] quinolina-7-ona, conocida como TAS-103 (Figura 6) es el compuesto más importante de esta familia debido a su actividad contra el cáncer. Ella muestra una fuerte actividad citotóxica con IC_{50} entre 1,2 y 3,7 $\mu\text{g/ml}$, actuando como un inhibidor dual de las topoisomerasas I y II (Mizutani y col, 2002). También se ha reportado para las indenoquinolinas una alta actividad bactericida. Se encontró que *Mycobacterium tuberculosis* es sensible a estos compuestos, observándose una concentración mínima inhibitoria (MIC) en el rango de 0,2 a 6 $\mu\text{g/ml}$ (Upadhayaya y col, 2011)

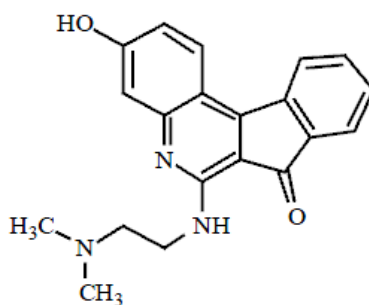


Figura 6 Estructura general de 6 - [[2 (dimetilamino) etil] amino]-3-hidroxi-7H-indeno [2,1-c] quinolina-7-ona (TAS-103) Perteneciente a la familia de indenoquinolinas con una alta actividad contra el cáncer. (Tomado de Mizutani y col, 2002)

En vista de las características que presentan las quinolinas, resulta interesante considerar el estudio de su potencial terapéutico contra la leishmaniasis. Dentro de la gran familia de quinolinas se han seleccionado un grupo de Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas (Ver Figura 7), a fin de estudiar sus efectos sobre *Leishmania mexicana* y evaluar su potencial uso en el tratamiento de la leishmaniasis.

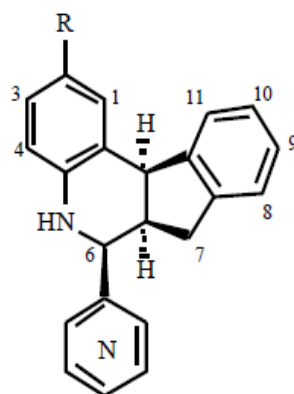


Figura 7. Estructura general de Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas (Tomado de Kouznetsov y col, 2006)

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas sobre la viabilidad de *Leishmania mexicana*.

2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas sobre la viabilidad de promastigotes.
- Determinar el efecto de las Indeno [2,1-c] quinolinas sobre la morfología y progresión del ciclo celular de promastigotes.
- Evaluar el efecto de Indeno [2,1-c] quinolinas sobre el potencial transmembrana mitocondrial en promastigotes.
- Estudiar la existencia de sinergismo entre las Indeno [2,1-c] quinolinas que presenten mayor citotoxicidad contra promastigotes.
- Evaluar el efecto citotóxico de las Indeno [2,1-c] quinolinas sobre macrófagos múridos de la línea celular J774.
- Evaluar el efecto de las Indeno [2,1-c] quinolinas sobre la sobrevivencia intracelular de amastigotes, utilizando la línea celular de macrófagos múridos J774.

3. Materiales y Métodos

3.1 Cultivo de parásitos

Se cultivaron promastigotes de *Leishmania mexicana* MHOM/BZ/62/BEL21 (BEL-21) a 25°C en medio T-Y [Tryptosa 10mg/L, Extracto de levadura 2,5 mg/L, Na₂HPO₄ 9mM, NaCl 130mM] pH 7,5 suplementado con 5% de suero fetal bovino (GIBCO) inactivado por calor (56°C, 30min). Este medio de cultivo es una modificación del descrito por Limoncu y colaboradores (1997).

3.2 Cultivo de macrófagos

Los macrófagos de la línea celular múrida J774 se cultivaron en medio RPMI 1640 con glutamina, suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO) inactivado, 100U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron en una estufa a 35°C en una de atmósfera de 5% CO₂ y 90% de humedad.

Una vez que los macrófagos alcanzaron la confluencia, se removió el medio de cultivo y se agregó PBS frío estéril, a fin de separar las células de sus uniones al soporte, así como las uniones entre las células. Se centrifugó la suspensión celular a 250g y el pellet se resuspendió en PBS. La viabilidad celular se determinó mediante el Test de Exclusión del Azul Tripano, método de tinción histológica que diferencia células vivas de células muertas, basado en la diferente permeabilidad del colorante en cada caso. En este método las células vivas no son coloreadas debido a que son muy selectivas a los compuestos que deja pasar a través de la membrana por lo que el azul de tripano no entra a la célula. En el

caso de las células muertas el colorante atraviesa la membrana, por lo tanto muestran un distintivo color azul bajo el microscopio.

3.3 Contaje celular.

El número de los parásitos se determinó por contaje directo en la Cámara de Neubauer (utilizando la siguiente fórmula: $N^{\circ} \text{ Células} = [\text{Promedio de células contadas en el cuadrado central}] \times [10^4] \times [25] \times [\text{Factor de dilución}] \times [\text{ml de cultivo}]$) previa dilución 1/2 con formaldehído al 2% en PBS.

La determinación del número de macrófagos se realizó por contaje directo en la Cámara de Neubauer utilizando la siguiente expresión: $N^{\circ} \text{ Células} = [\text{Promedio de células contadas en 4 cuadrados secundarios}] \times [10^4] \times [\text{Factor de dilución}] \times [\text{ml de cultivo}]$.

3.4 Preparación de las drogas e indenoquinolinas.

Las Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Biología Experimental, UCV. Fueron sintetizadas en el laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular de la Universidad Industrial de Santander, Colombia; a partir de grupos de anilinas p-sustituidas (**1**) α , β , γ -piridinacarbaldéidos (**2**) e indeno (**3**) en presencia de acetonitrilo y exceso de trifluoruro de boro-dietil éter ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$), como se muestra en la figura 8 (Kouznetsov y col, 2006). Se prepararon soluciones stock de las indenoquinolinas a 10mg/ml disueltas en DMSO (dimetil sulfóxido). La Anfotericina (FUNGIZONE) fue adquirida comercialmente (Bristol-Myers Squibb) y disuelta en H_2O bi-destilada a una concentración stock de 5mg/ml. La miltefosina fue

gustosamente donada por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Biología Experimental, UCV. Se disolvió en etanol a concentración stock de 1mM. Las diluciones de indenoquinolinas, anfotericina y miltefosina correspondientes para cada ensayo se realizaron en medio de cultivo el día de su uso.

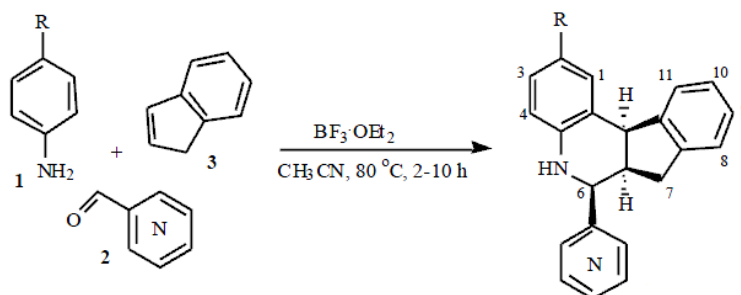


Figura 8 Síntesis de Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas (Tomado de Kouznetsov, 2006).

3.5 Evaluación de la actividad leishmanicida de las indeno quinolinas

Con la finalidad de ensayar la citotoxicidad de diez Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas (CRIS119, CRIS110, AR1, AR57, AR59 AR60, AR61, AR62, AR65, AR66) (Figura 9) se utilizó el método propuesto por Rojas y colaboradores (2010) con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión de 4×10^6 promastigotes/ml y se colocaron 2×10^5 parásitos por pozo en una placa de 96 pozos con los derivados de Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas a concentraciones crecientes de $0,3 \mu\text{g/ml}$ a $40 \mu\text{g/ml}$ y se incubaron a 25°C por 48 horas. Se realizó un ensayo control con DMSO utilizando las mismas concentraciones de este compuesto presente en las diluciones de las drogas e indenoquinolinas, a fin de demostrar que el efecto observado es propio del producto utilizado y no del disolvente aplicado. Como control positivo se realizó el

mismo ensayo pero con dos productos comerciales con actividad antileishmania conocida, Anfotericina B (0,006 a 0,75 µg/ml) y Miltefosina (0,64 a 81,6 µg/ml). Los parásitos fueron incubados bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Adicionalmente se dispuso de medio T-Y suplementado como blanco y un control con la misma cantidad de parásitos en ausencia de droga.

La viabilidad *in vitro* de los parásitos se determinó después de 48 horas mediante el ensayo de MTT, cuyo principio se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), llevada a cabo por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, con la formación de un compuesto coloreado de color azul-violeta insoluble (formazán). La presencia de este colorante es proporcional al número de células metabólicamente activas. (Mosmann, 1983). Una vez culminada la incubación se agregó a cada pozo 50 µL de MTT (1 mg/ml) y se incubó la placa a 25°C por 4 horas. La interrupción de la reacción enzimática y la extracción y solubilización del formazán se llevó a cabo agregando 50 µl/pozo de SDS (*sodium dodecyl sulfate*) al 20%. El número de promastigotes vivos fue determinado indirectamente midiendo la cantidad de formazán a 570 nm en un lector de ELISA. Seguidamente se calculó el porcentaje de viabilidad e inhibición mediante las siguientes formulas:

$$\%Viabilidad = 100 \times (AT-AB)/(AC-AB)$$

$$\%Inhibición = 100 - \% Viabilidad$$

Donde:

AC= Absorbancia de parásitos no tratados

AT= Absorbancia de parásitos tratados con la droga

AB= Absorbancia del medio de cultivo

La concentración inhibitoria media (IC_{50}) valor que expresa la concentración del producto que elimina la mitad de la población celular, se calculó con el programa PRISMA 5.0 el cual estableció dicho valor mediante una regresión no lineal y el análisis de la curva sigmoide del logaritmo de la dosis versus el porcentaje de inhibición.

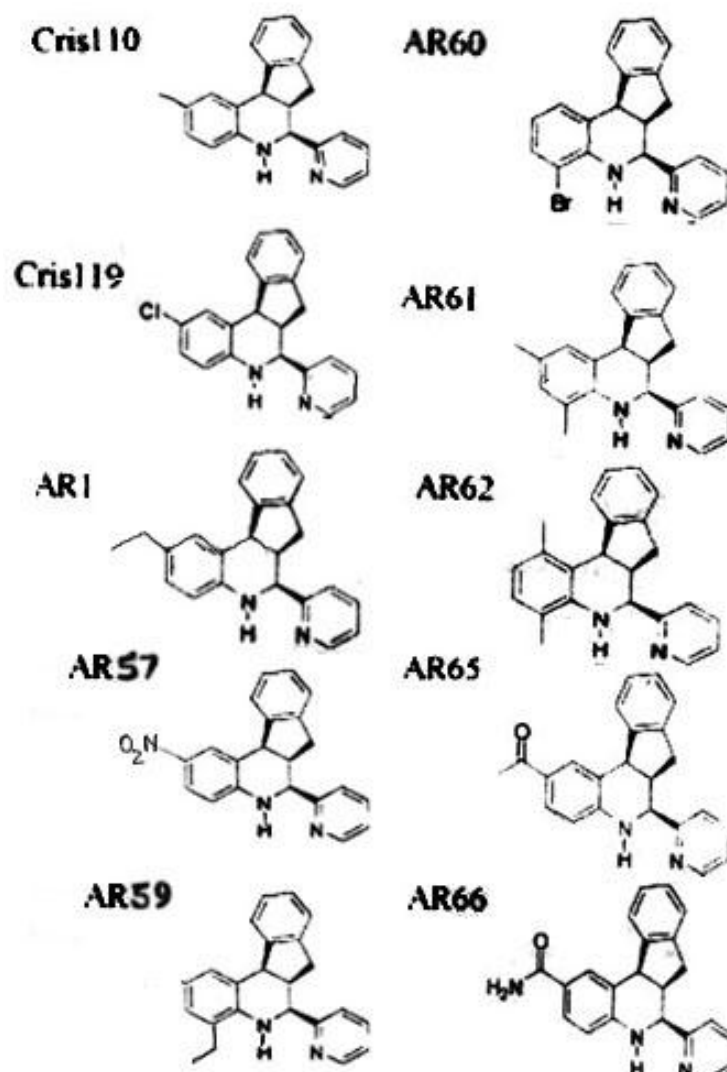


Figura 9 Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas evaluadas en este trabajo.

3.6 Evaluación del efecto sobre la viabilidad celular de los promastigotes en el tiempo

Se incubaron 3×10^6 cel/ml con cada compuesto a una concentración de 40 µg/ml, durante 72 horas a 25°C. Se tomaron alícuotas a las 24, 48 y 72 horas y se contó el número de promastigotes en la cámara de Neubauer.

3.7 Evaluación del efecto sobre la morfología de los promastigotes

Se incubaron 3×10^6 cel/ml con cada compuesto a una concentración de 40 µg/ml, durante 48 horas a 25°C. Luego se observaron las modificaciones a nivel morfológico mediante microscopía de contraste de fase y fluorescencia con naranja de acridina según lo reportado por Barreca y col (1997) con un objetivo de 100X en un microscopio NIKON Eclipse. El fluorocromo naranja de acridina (o N,N,N',N'-tetrametilacridina) es un colorante catiónico selectivo para los ácidos nucleicos en su forma nativa o desnaturalizada. Interactúa con el ADN por intercalación dentro de la molécula y con el ARN por atracciones electrostáticas. Sin embargo, en la cromatina condensada, la mayor parte del ADN se empaqueta en una forma que no permite la intercalación eficiente del colorante. Cuando está asociado al ADN, el colorante es espectralmente similar a la fluoresceína, presentado un máximo de excitación a 502 nm y una emisión a 525 nm (en el verde). Al asociarse con el ARN, la excitación máxima deriva a 460 nm (en el azul) y la emisión máxima a 650 nm (en el rojo) (Tomado de: Seminario de Tinciones <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm>)

3.8 Evaluación del efecto sobre el potencial trans-membrana mitocondrial.

El cambio en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_M$) en promastigotes intactos se observó mediante la acumulación de rodamina-123 siguiendo el protocolo de Wolfson (1987) con algunas modificaciones. Se incubaron 2×10^6 parásitos con las indenoquinolinas a $40 \mu\text{g/ml}$ por 48 horas a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de los parásitos (tratados y control) y se incubaron con rodamina-123 a $10 \mu\text{M}$ por 2 horas a 25°C . Previamente se prepararon cubreobjetos cubriéndolos con polilisina (1mg/ml) durante 30 min, para luego lavar 2 veces con PBS. Se colocaron los parásitos sobre los cubre objetos y luego de 10 min se colocaron los cubreobjetos sobre portaobjetos para su observación al microscopio de fluorescencia. El fluoróforo Rhodamina 123 constituye un marcador específico de mitocondrias. Se distribuye entre las membranas mitocondriales según el potencial electroquímico de H^+ a través de la membrana interna de este organelo. La acumulación en el interior de las mitocondrias, como consecuencia del gradiente de protones existente en la misma y de las características fisicoquímicas del compuesto (elevada lipofilicidad, carga deslocalizada), determina la presencia del $\Delta\Psi_M$. En presencia del gradiente transmembrana la rodamina fluoresce mientras que en ausencia del mismo se pierde la fluorescencia. Como control negativo los parásitos tratados con Rodamina-123 se incubaron con $5 \mu\text{l}$ de carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP) a 2mM . Luego de 30 minutos se realizó la observación. El FCCP (ácido lipofílico débil) es un agente químico que desacopla la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria, sin afectar la estructura mitocondrial. La forma protonada

pasa a través de la membrana interna mitocondrial intacta. En la matriz, a pH más bajo, el ácido débil se disocia, disipando el gradiente de protones y el potencial de membrana. En consecuencia, al no haber bombeo de protones a través de la ATP sintasa, es incapaz de producir ATP.

3.9 Estudios de sinergismo sobre promastigotes

Una vez determinados los valores de IC_{50} de las indenoquinolinas se evaluaron las combinaciones de compuestos con mayor efecto citotóxico, siguiendo el protocolo propuesto por Chou y col (1984) y Chou (1991) definido como Método de Índice de Combinación (MIC). Este método tiene como base ecuaciones matemáticas cuyos orígenes se derivan de las usadas en modelos de cinética enzimática. Los estudios de sinergismo se realizaron evaluando la mezcla de dos compuestos formando así combinaciones:

1. Entre las indenoquinolinas CRIS 110, AR 1 y AR 65.
2. Entre Miltefosina (fármaco comercial) y las indenoquinolinas: CRIS 110, AR1 y AR 65.

El ensayo se realizó sobre una placa de 96 pocillos y se ensayaron 3 diluciones por debajo y por encima del IC_{50} de ambos compuestos contenidos en la mezcla a una concentración tal que mantenga una proporción 1:1 de ambos índices. Para conocer las concentraciones de cada compuesto en cada pozo, se multiplicó el IC_{50} por los siguientes factores: 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8.

Una vez preparada la mezcla, se procedió con el ensayo de citotoxicidad incubando los promastigotes durante 48 h según el método descrito en la sección 3.5.

A continuación se calculó el índice de combinación (IC) utilizando la siguiente fórmula:

$$IC = FIC_A + FIC_B$$

$$IC = [IC_{50} \text{ A en la mezcla} / IC_{50} \text{ de A solo}] + [IC_{50} \text{ B en la mezcla} / IC_{50} \text{ B solo}]$$

Donde:

FIC_x = Índice de concentración inhibitoria fraccional.

IC_{50} = Concentración inhibitoria media.

El IC establece el grado de sinergismo, antagonismo o aditividad de las combinaciones (Si se obtiene $IC < 1$, $= 1$ y > 1 indica sinergismo, aditividad y antagonismo respectivamente). Para identificar el rango de IC se utilizó la Tabla 1.

Tabla 1. Rangos de IC referidos para la selección de los patrones de combinación de fármacos. (Tomado y modificado de Chou y Martin, 2005).

Rango del índice de combinación	Descripción
<0,1	Sinergismo muy fuerte
0,1-0,3	Sinergismo fuerte
0,3-0,7	Sinergismo
0,7-0,9	Sinergismo débil a moderado
0,90-1,1	Cercano a la aditividad
1,1-1,45	Antagonismo débil a moderado
1,45-3,3	Antagonismo
>3,3	Antagonismo fuerte a muy fuerte

Adicionalmente con los valores de IC_{50} se realizó la construcción de Isobogramas para cada combinación, permitiendo evidenciar las interacciones entre los compuestos de forma individual y en combinación.

3.10 Evaluación del efecto de las Indeno quinolinas sobre macrófagos de la línea celular J774.

Los macrófagos recolectados de los cultivos, se resuspendieron en una relación de 40×10^4 cel/ml y se sembraron 2×10^4 cel/pozo en placas de 96 pocillos. Se agregaron las indenoquinolinas, a concentraciones crecientes (0,3 µg/ml a 400 µg/ml) y se incubaron a 35°C, 5% CO₂ con 90% de humedad relativa durante 48 horas. Finalizado el tiempo de incubación, la viabilidad de los macrófagos se estimó mediante el método de MTT descrito anteriormente.

El valor de IC₅₀ se calculó con el programa PRISMA 5.0 el cual estableció dicho valor mediante una regresión no lineal y el análisis de la curva sigmoide del logaritmo de la dosis versus el porcentaje de inhibición.

3.11 Evaluación del efecto sobre amastigotes intracelulares.

Los macrófagos se resuspendieron en una relación de 5×10^5 cel/ml y se sembraron 2×10^5 cel/pozo sobre cubreobjetos estériles en placas de 6 hoyos. Se incubaron a una temperatura de 37 °C, 5% CO₂ con 90% de humedad relativa durante 24 horas. Después de este período se realizaron 2 lavados con PBS estéril removiendo los macrófagos no adheridos y luego se infectaron con promastigotes en fase estacionaria en medio RPMI1640 durante 4 horas, en una proporción de 10 promastigotes por macrófago (10:1). Después de 4 horas los parásitos extracelulares se removieron mediante 3 lavados con PBS estéril. Se incubó la placa por 24 horas y se retiró el medio, a continuación los macrófagos se

incubaron durante 48 horas y 72 horas con 10µg/ml de las indenoquinolina bajo las condiciones de temperatura y atmósfera descritas anteriormente. Finalizado este tiempo se tomaron los cubreobjetos, se fijaron las células sumergiéndolas en metanol y se tiñeron con colorante de Giemsa. Esta tinción se basa en la distinta afinidad que demuestran las células y sus componentes a los distintos colorantes incluidos en el colorante de Giemsa lo que hace posible identificar parásitos dentro de la célula hospedera. Los núcleos de células y protozoarios se observan en color violeta mientras que el citoplasma en color rosado. El número de macrófagos infectados y el número de amastigotes por macrófago se determinó mediante observación al microscopio de 100 macrófagos por cubreobjeto, realizado por triplicado para cada tiempo de exposición a las indenoquinolinas.

La diferencia estadística entre la cantidad promedio de amastigotes por macrófago en ausencia y presencia de las indenoquinolinas se obtuvo mediante la prueba t de Student usando el programa Graph-Pad Prisma.

4. Resultados y Discusión

4.1 Actividad leishmanicida de las indeno quinolinas

A fin de estudiar el efecto de las Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania mexicana*, se incubaron los parásitos durante 48 horas con concentraciones crecientes de 10 indenoquinolinas con distintas sustituciones. La figura 9 muestra las curvas del logaritmo de la dosis versus el porcentaje de inhibición. Se observó que la mayoría de los compuestos (incluyendo la Anfotericina B y la Miltefosina utilizadas como control de citotoxicidad) lograron inducir un 100% de inhibición a las concentraciones utilizadas. El efecto de AR 57, AR 62, AR 66 solo alcanzó una inhibición máxima entre 60 y 90%. A partir de estos datos de % de inhibición se calcularon los IC_{50} para cada indenoquinolina, los cuales se muestran en la Tabla 2. Cos y colaboradores (2006) propusieron un criterio de actividad válido en estudios citotóxicos de compuestos naturales sobre microorganismos, indicando que valores de $IC_{50} < 100 \mu g/ml$ para extractos y valores de $IC_{50} < 25 \mu M$ para compuestos puros, pueden ser considerados como fármacos potenciales. Tomando este criterio, los resultados muestran una alta potencialidad de las indenoquinolinas ensayadas, como posibles compuestos contra el parásito.

Las indenoquinolinas ensayadas presentan sustituciones en el anillo de piridina en la posición 2, 4, 2-4 y 1-4. Si bien las sustituciones no permiten establecer una relación estructura-actividad, las indenoquinolinas 2-sustituidas

presentan en general mayor actividad citotóxica contra *Leishmania*. Los compuestos CRIS 110 y AR61 poseen la misma sustitución en la posición 2-piridil, pero una sustitución adicional en la posición 4-piridil de AR61 genera un incremento del IC_{50} . Los compuestos AR1 y AR59 poseen la misma sustitución en la posición 2 y 4 respectivamente y el solo hecho de cambiar la sustitución de la posición 2 a 4-piridil provoca un incremento del IC_{50} de AR59. Al comparar AR61 con AR62, se puede observar que el cambio de posición del grupo CH_3 de la posición 2 a la posición 1-piridil disminuye aproximadamente 6 veces la actividad de la indenoquinolina.

En el caso de la Anfotericina B y la Miltefosina se obtuvieron IC_{50} de 0,043 y 1,81 $\mu g/ml$ respectivamente, estos resultados están en el rango de lo reportado para promastigotes de diferentes especies de *Leishmania* (Escobar y col, 2002). El compuesto CRIS 110 con un IC_{50} 0,2 $\mu g/ml$, fue el que presentó la mayor actividad citotóxica. Es 10 veces menor que la Anfotericina B pero 10 veces más activo que la Miltefosina. Los compuestos CRIS 119 (IC_{50} 1,9 $\mu g/ml$) y AR 1 (IC_{50} 2,4 $\mu g/ml$) presentaron una actividad comparable con la Miltefosina.

Los resultados obtenidos para las indenoquinolinas, con valores de IC_{50} de 0,64 a 37,54 μM (Anexo) son comparables con lo reportado en la bibliografía para compuestos quinolínicos en varias especies de *Leishmania*. Tempone y colaboradores (2005) realizaron un estudio con Quinolinas 3-sustituidas en promastigotes de *L.chagasi* encontrando valores de IC_{50} de 0,3 a 90 μM . Por otra parte, Kouznetsov y colaboradores (2007) ensayaron una serie de Tetrahydroquinolinas sobre la misma especie, encontrando un $IC_{50}=23,89\mu M$ para la 4-metil-8-isopropil-2-(3-piridil) quinolina.

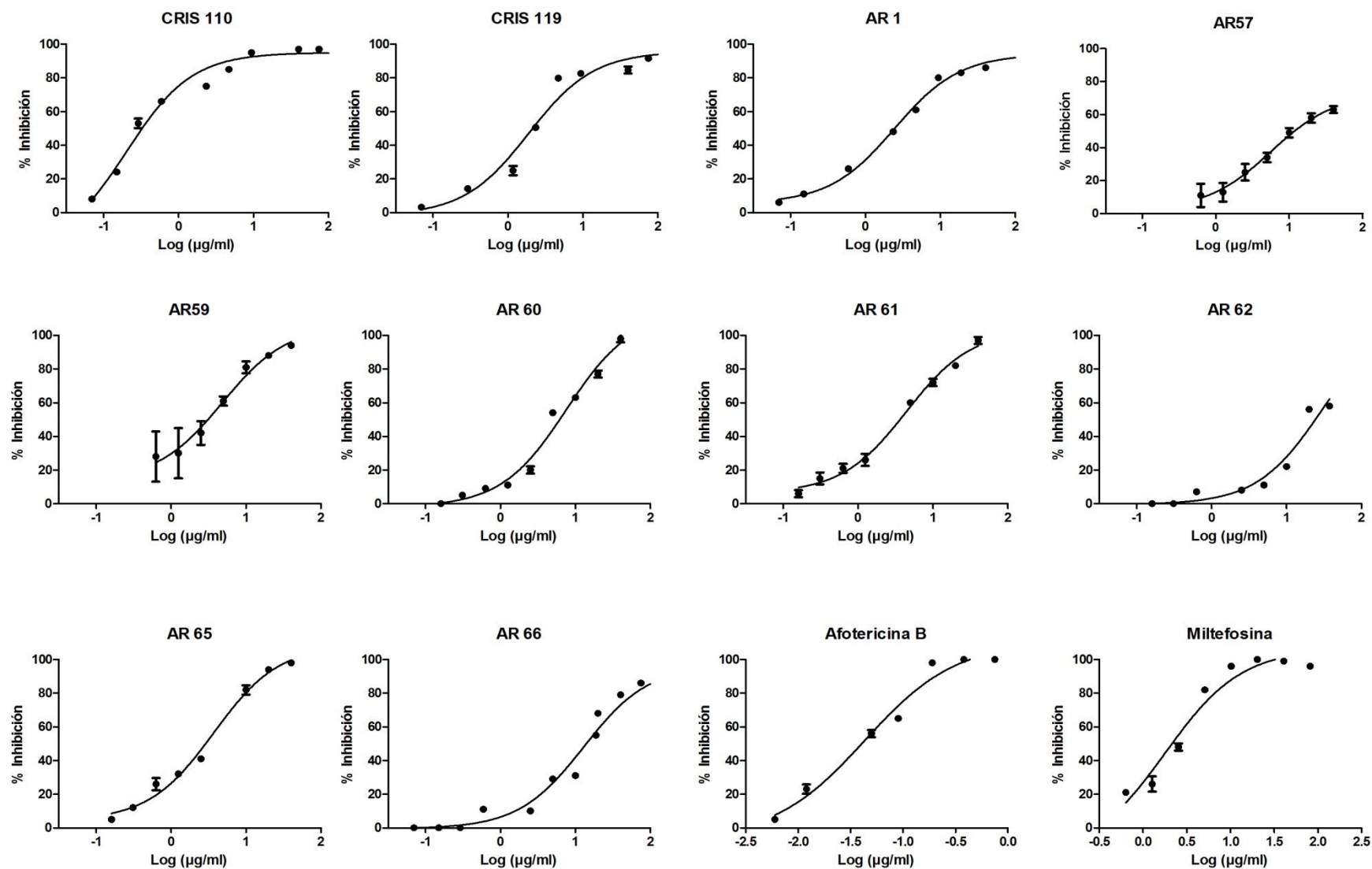
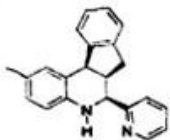
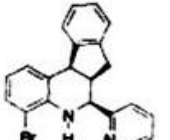
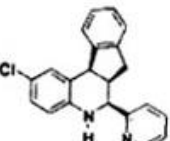
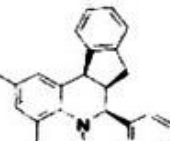
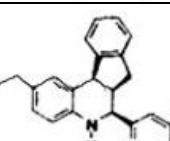
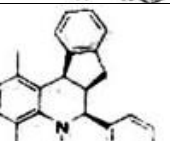
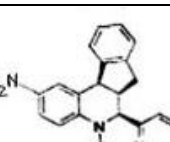
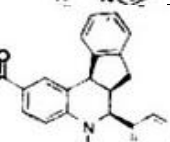
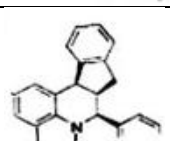
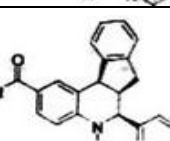


Figura 9 Curvas logaritmo dosis-respuesta de las indenoquinolinas, Anfotericina B y Miltefosina sobre promastigotes de *L. mexicana*. Se muestra el % de inhibición celular vs logaritmo de la concentración del compuesto (µg/ml). Los datos son el producto de por lo menos 3 ensayos independientes realizados por duplicado

Tabla 2. Valores de IC₅₀ de las Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas obtenidos para promastigotes de *Leishmania mexicana* incubados durante 48 horas.

Compuesto		IC ₅₀ (µg/ml)	Sustitución	Compuesto		IC ₅₀ (µg/ml)	Sustitución
CRIS 110		0,203±1,21	R2	AR 60		10,08±1,22	R4
CRIS 119		1,9±1,26	R2	AR 61		5,7±1,19	R2, R4
AR 1		2,44±1,10	R2	AR 62		31,8±2,11	R1, R4
AR 57		5,6±2	R2	AR 65		3,7±1,18	R2
AR 59		4,8±1,7	R4	AR 66		12,8±1,31	R2
Anfotericina B		0,043±1,24	-	Miltefosina		1,81±1,4	-

A fin de evaluar si la actividad antileishmania de las indenoquinolinas permanece en el tiempo, se determinó la viabilidad de los promastigotes incubados a las 24, 48 y 72 horas con los compuestos. La figura 10 muestra la gráfica de viabilidad celular vs tiempo de incubación. La línea paralela al eje de las X representa el número de parásitos inicial, en consecuencia valores por debajo de la misma, indican un efecto citotóxico; valores sobre la línea indican una inhibición de la multiplicación celular (efecto citostático), mientras que valores por encima indican proliferación celular.

Las indenoquinolinas que mantienen un efecto citotóxico durante el período evaluado fueron CRIS 110, AR1 y AR 65. AR 61 tiene un efecto citotóxico a partir de las 48 horas. Las indenoquinolinas CRIS 119, AR59, AR 57, AR 60 y AR 66 tienen un efecto citotóxico o citostático que se revierte a las 72 horas de tratamiento, este efecto transitorio puede tener su origen en la inactivación de la indenoquinolina o en el alto recambio de su molécula blanco. Por último, AR 62 fue el compuesto con menor efecto sobre la proliferación del parásito.

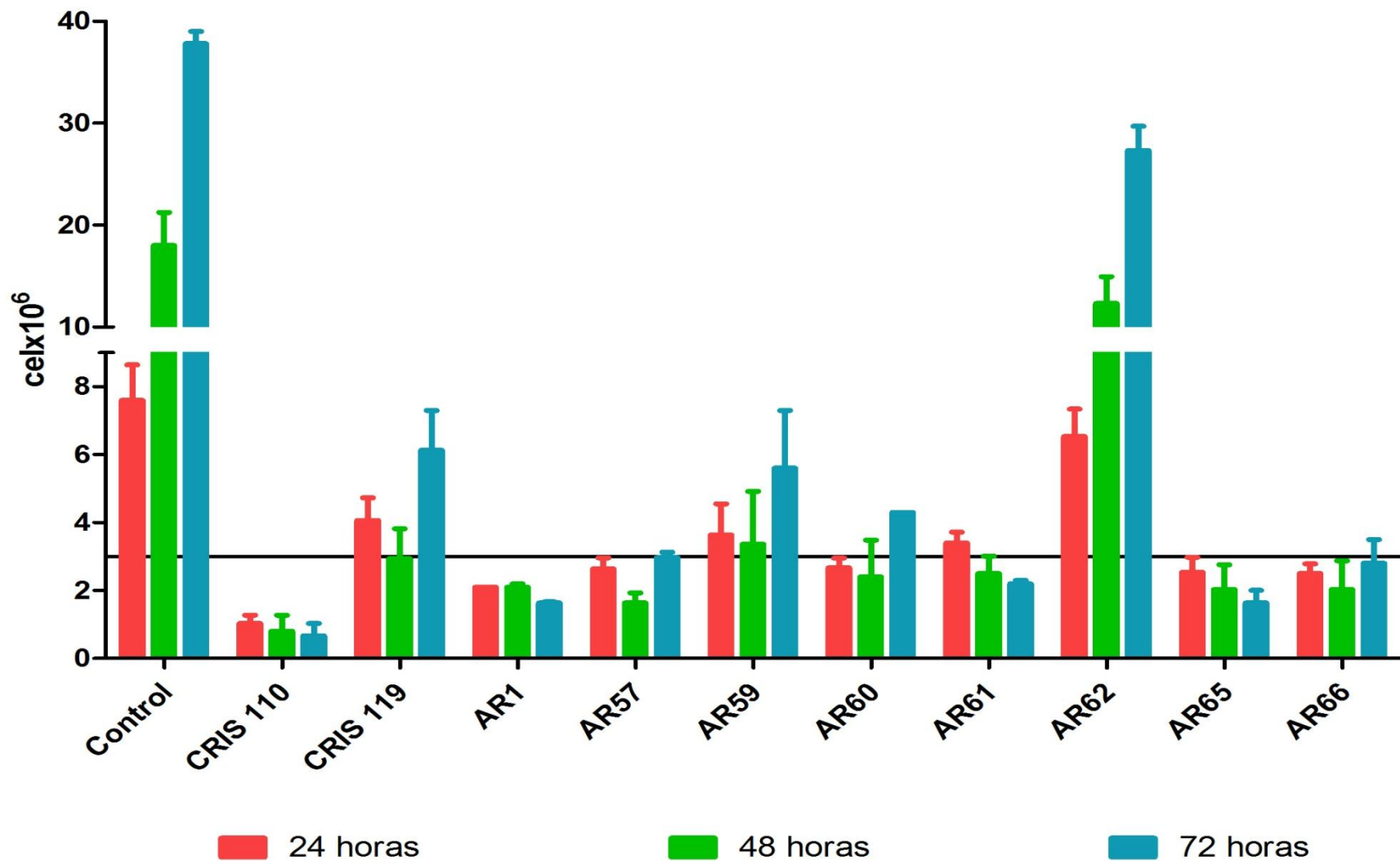


Figura 10. Efecto de las indenoquinolinas sobre la proliferación de los promastigotes de *L.mexicana* a las 24, 48 y 72 horas de incubación con 40 µg/ml de los compuestos. Los datos son el producto de 3 ensayos independientes.

4.2 Efecto de las indeno quinolinas sobre la morfología de los promastigotes

La evaluación mediante microscopía de contraste de fase y fluorescencia con naranja de acridina, de la morfología de los parásitos tratados con 40 µg/ml de las indenoquinolinas durante 48 horas, reveló alteraciones en la división celular, siendo frecuente la observación de células binucleadas o detenidas en el proceso de citocinesis en los parásitos incubados con algunas de las indenoquinolinas (Figura 11). En *L. mexicana* la división celular comprende cuatro eventos secuenciales, duplicación del flagelo, núcleo, kinetoplasto y finalmente la citocinesis (Wheeler y col, 2011). En la muestra tratada con CRIS 119 se encontraron células que presentan múltiples núcleos y un solo flagelo (Fig. 11C) lo cual muestran un efecto sobre dicha secuencia de división, ya que solo ocurre la duplicación del núcleo. Los parásitos tratados con CRIS110 aparecen detenidos en citoquinesis (Fig. 11B) mostrando un efecto al final de la división celular. El efecto de AR65 y AR1 parece ser diferente ya que altera la forma del parásito generando células redondeadas como se puede observar en la Figura 11D y 11E. El resto de los compuestos no provocaron cambios morfológicos apreciables ni multinucleación celular.

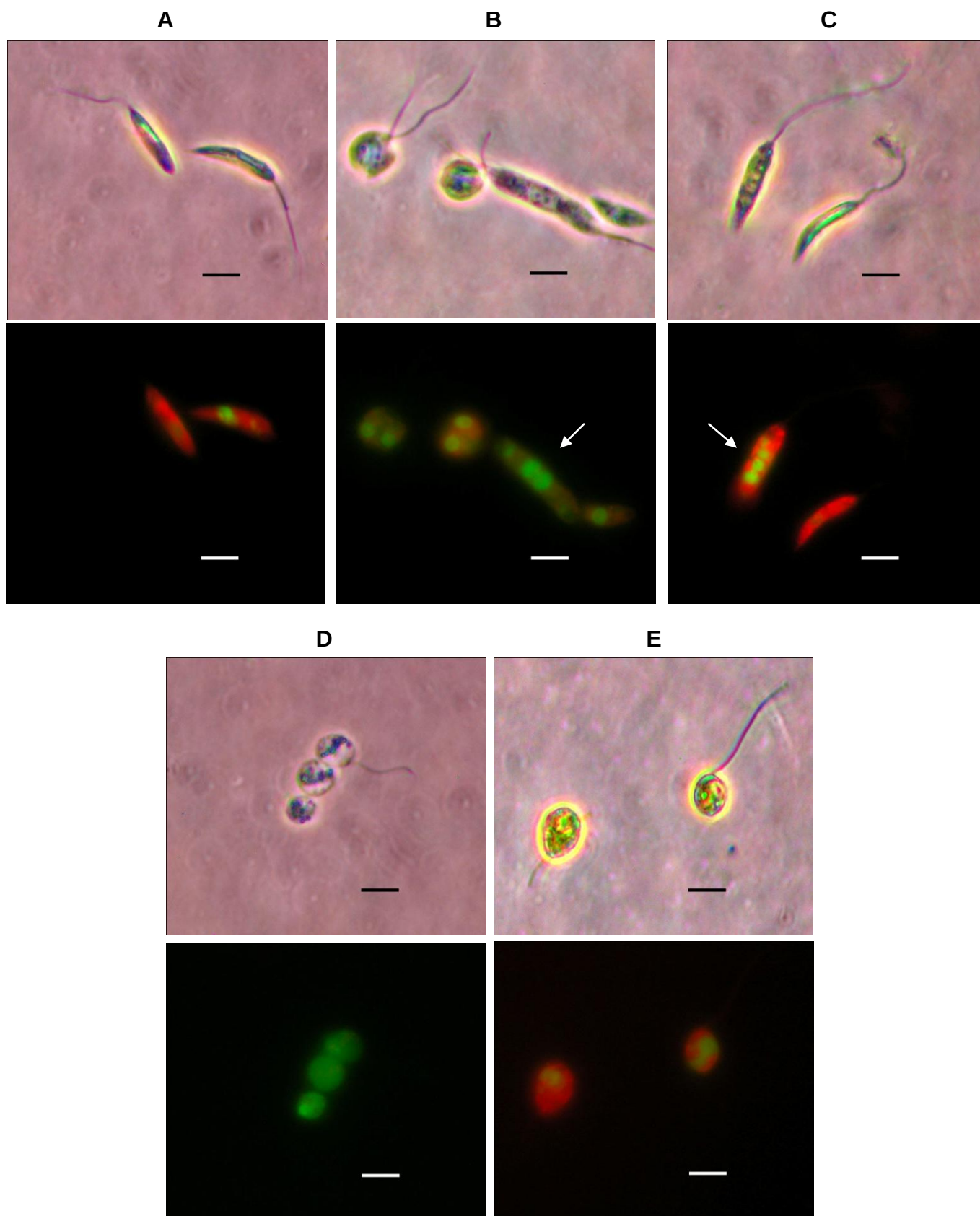


Figura 11 Cambios morfológicos producidos en promastigotes de *L. mexicana*: Control (A) CRIS110 (B) CRIS119 (C), AR1 (D) AR65 (E). Las flechas señalan las células multinucleadas. La barra representa 10µm

4.3 Efecto de las indeno quinolinas sobre el $\Delta\Psi_M$ de los promastigotes

Se ha demostrado que las indenoquinolinas tienen un marcado efecto inductor de la apoptosis en células cancerosas (Kluza y col, 2000). Con la finalidad de explorar el posible efecto apoptótico de las indenoquinolinas ensayadas sobre promastigotes, se determinó el efecto de las mismas sobre $\Delta\Psi_M$. Para ello los parásitos tratados con las indenoquinolinas durante 48 horas, se incubaron con rodamina-123.

Las Figuras 12 y 13 muestran micrografías de contraste de fase y microscopia de fluorescencia con Rodamina-123, tomadas luego de finalizado el tratamiento de los parásitos con las indenoquinolinas con mayor actividad contra *Leishmania* (CRIS 110, CRIS 119, AR1 y AR 65). La figura 12B muestra la fluorescencia del mitocondrion en los parásitos sin tratamiento con las indenoquinolinas (control positivo). Después de 30 min de incubación con FCCP (Figura 12D), se observó la perdida de la fluorescencia, demostrando la pérdida del $\Delta\Psi_M$ (control negativo).

Los parásitos tratados con CRIS 119 muestran una fluorescencia semejante a la del control pero aproximadamente un 51% del total de parásitos por campo pierde la fluorescencia totalmente, como se puede observar al comparar las micrografías 13A y 13B, lo cual sugiere que los parásitos con fluorescencia posiblemente sean resistentes a CRIS 119, ya que mantienen su $\Delta\Psi_M$. En el caso de los parásitos tratados con CRIS 110, AR 1 y AR 65, todos los parásitos

muestran pérdida de la fluorescencia lo cual indica el colapso del $\Delta\Psi_M$ (Figura 13D, F y H).

Kluza y colaboradores (2000) demostraron que TAS-103 (una 7H-indeno [2,1-c] quinolina) genera en células cancerosas una serie de eventos apoptóticos entre los cuales se encuentran la inducción de una caída del potencial de membrana mitocondrial y una marcada disminución en el pH intracelular. El efecto que las Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas provoca sobre el $\Delta\Psi_M$ de los promastigotes podrían estar indicando la inducción de apoptosis. Otros marcadores apoptóticos deben ser evaluados para confirmar la inducción de la muerte celular programada por parte de las indenoquinolinas

Los resultados encontrados en estos ensayos, permitieron la selección de 3 indenoquinolinas (CRIS110, AR1 y AR65) para la realización de estudios de sinergia y la evaluación del efecto sobre la forma intracelular del parásito, dado su alto efecto citotóxico perdurable en el tiempo, su efecto sobre la morfología del parásito y sobre la división celular, además de su capacidad para generar la pérdida del $\Delta\Psi_M$ y posiblemente una inducción de la apoptosis.

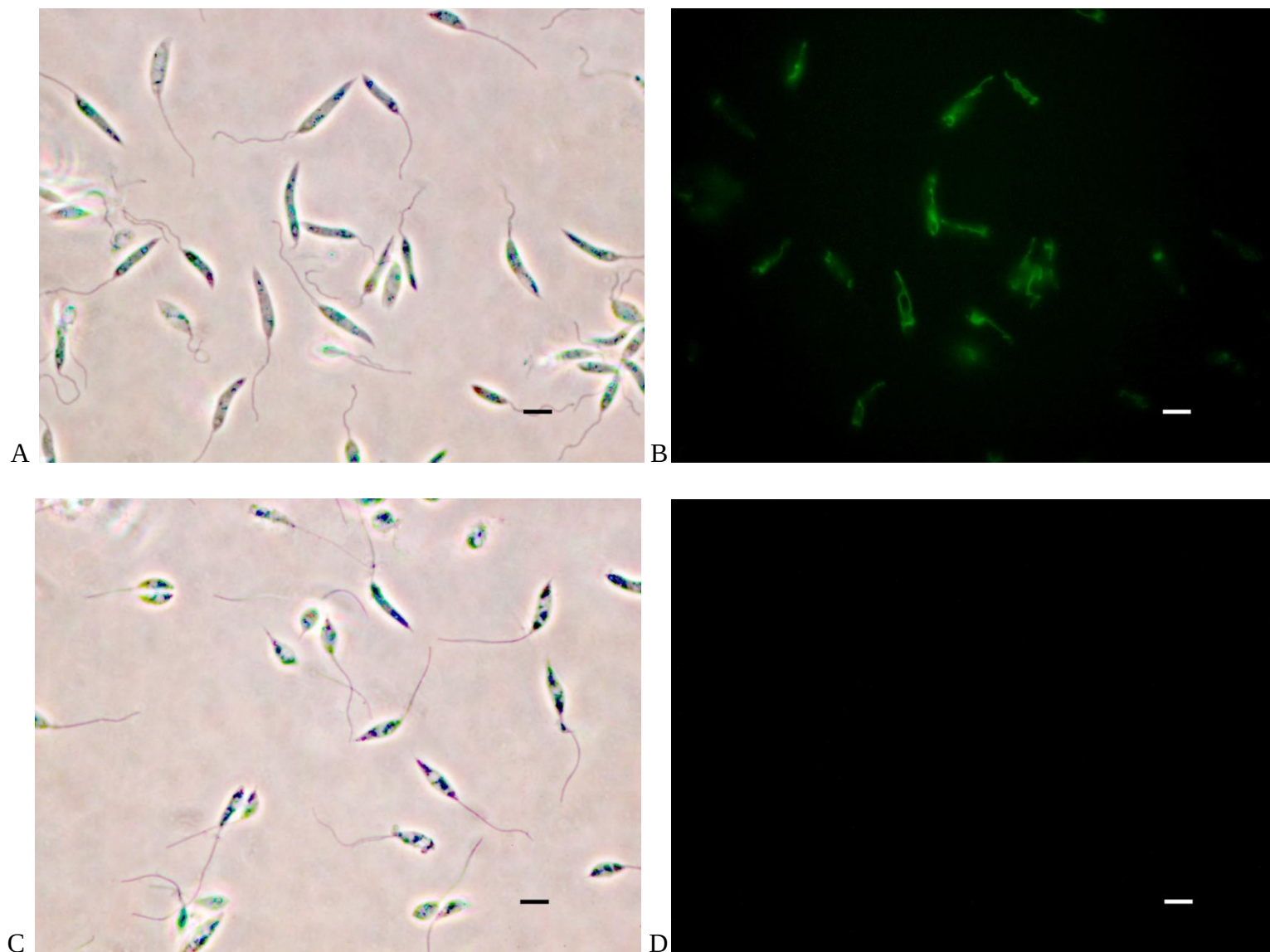


Figura 12 Fluorescencia con rodamina-123 de promastigotes de *L. mexicana* después de 48 horas. Muestra control en ausencia de indenoquinolinas (**A** y **B**) muestra control incubado 30min con FCCP (**C** y **D**) La pérdida de fluorescencia es total en presencia de un ionóforo de protones que colapsa el $\Delta\Psi_M$. La barra representa 10μm.

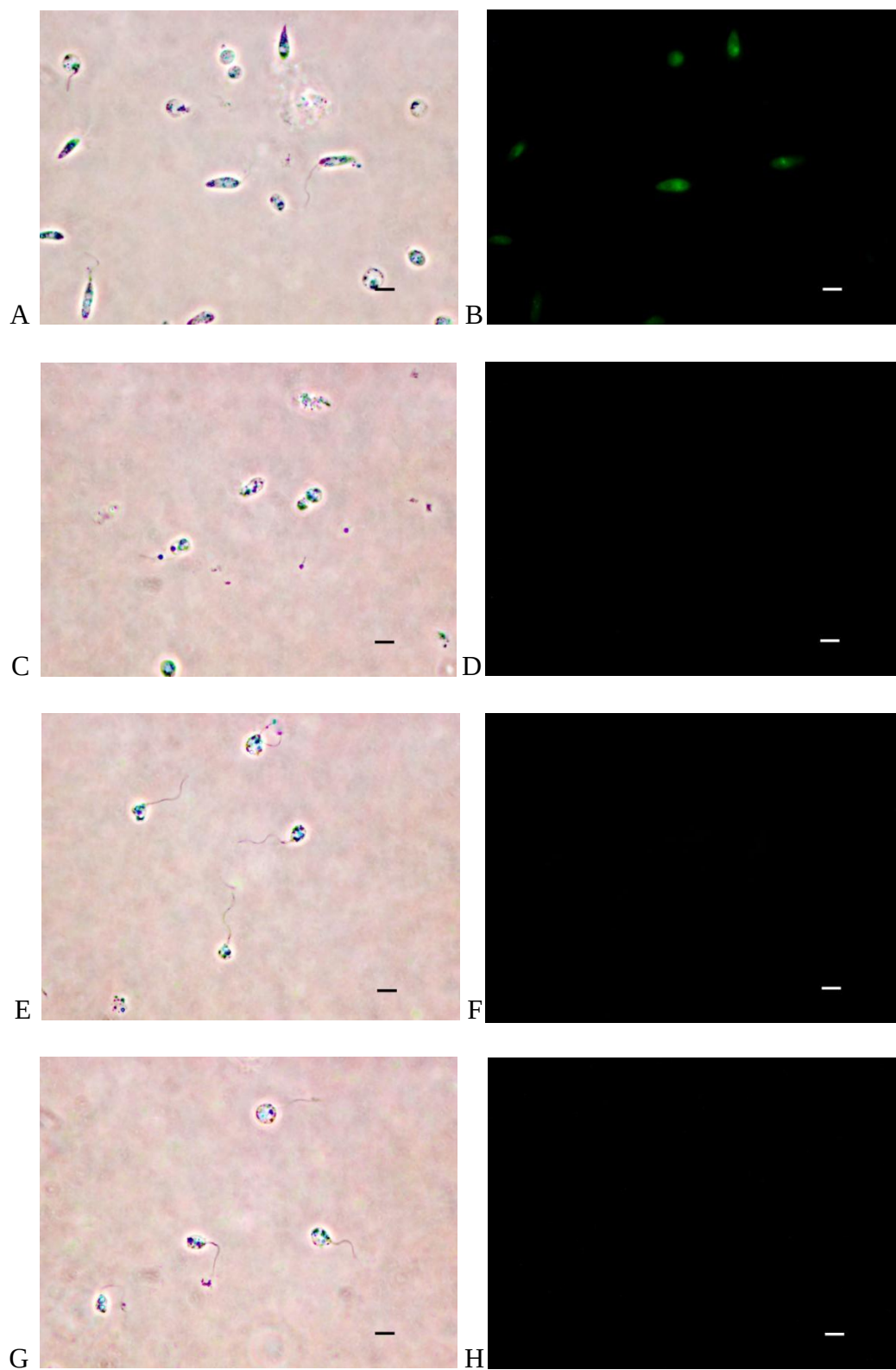


Figura 13 Fluorescencia con Rodamina-123 de promastigotes de *L. mexicana* incubados durante 48 horas con 40µg/ml de: CRIS 119 (**A y B**) CRIS 110 (**C y D**) AR 1 (**E y F**) AR 65 (**G y H**). La barra representa 10µm

4.4 Estudio del sinergismo entre las indeno quinolinas y miltefosina sobre promastigotes.

Se procedió a evaluar la respuesta de las indenoquinolinas en combinación entre ellas mismas y con el fármaco comercial Miltefosina. Para ello se seleccionaron las indenoquinolinas CRIS 110, AR 1 y AR 65 por su efecto sobre el parásito demostrado en los ensayos anteriores. Con los resultados se procedió a la construcción de los Isobologramas (Figura 14), gráficas que permiten comparar el efecto de los compuestos por separado con los obtenidos en combinación. Valores de IC₅₀ de la mezcla por debajo de la recta representan sinergismo, valores sobre la recta representan aditividad y valores por encima de la recta muestran antagonismo. Los resultados muestran sinergismo para las combinaciones realizadas con AR1 (Figura 14 B y 14 C). Mientras que el resto de las combinaciones resultaron antagónicas. En la tabla 3 se muestran los IC calculados para cada una de las combinaciones evaluadas, donde se puede observar que según lo descrito por Chou y Martin (2005) la combinación de AR1 con CRIS 110 y con AR 65 resultan en “*Sinergismo*” y la combinación de CRIS 110 + AR 65 originó un “*Antagonismo fuerte a muy fuerte*”. En el caso de las indenoquinolinas combinadas con Miltefosina dieron como resultado “*Antagonismo*”, es decir, la interacción de estas indenoquinolinas con dicho fármaco comercial llevan a la disminución del efecto de la Miltefosina. Estos resultados muestran que combinando la indenoquinolina AR1 con CRIS 110 y con AR 65 se logra potenciar el efecto citotóxico sobre el parásito.

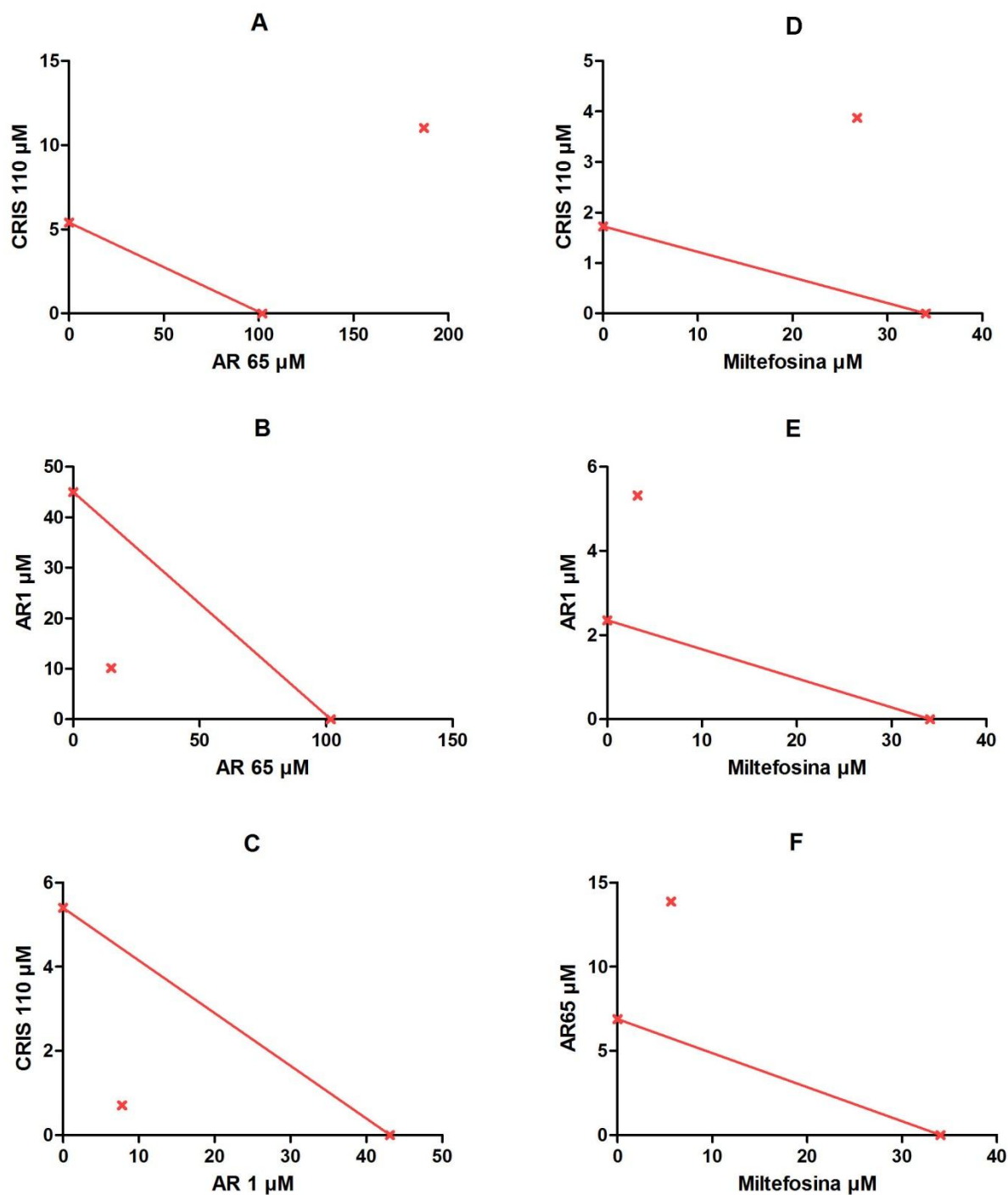


Figura 14 Isobogramas obtenidos para cada una de las combinaciones realizadas sobre promastigotes de *L. mexicana* incubados durante 48 horas. Combinación entre CRIS 110, AR 1 y AR 65 (A, B y C). Combinación entre Miltefosina y los compuestos: CRIS 110, AR 1 y AR 65 (D, E y F)

Tabla 3. Índices de combinación (IC) de las combinaciones ensayadas obtenidos para promastigotes de *L.mexicana*

Combinación	IC	Tipo de sinergismo
AR 65 + CRIS 110	3,9	Antagonismo fuerte a muy fuerte
AR 65 + AR1	0,4	Sinergismo
AR 1 +CRIS 110	0,3	Sinergismo
Miltefosina + CRIS 110	3,0	Antagonismo
Miltefosina + AR 1	2,4	Antagonismo
Miltefosina + AR 65	2,2	Antagonismo

4.5 Efecto de las indeno quinolinas sobre MΦ múridos de la línea J774

A fin de estimar la selectividad de las Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas que tuvieron una mayor actividad sobre la viabilidad del parásito (CRIS 110, AR1 y AR65), se realizó el estudio del efecto citotóxico sobre macrófagos múridos de la línea J774 incubados por 48 horas con dichas moléculas. La figura 16 muestra las curvas del logaritmo de la dosis versus el porcentaje de inhibición obtenido. Se observó que a una concentración de 400 µg/ml de CRIS 110, AR 1 y AR 65, solo se obtuvo un 60% de inhibición. A las concentraciones IC₅₀ encontradas para los promastigotes de *L. mexicana*, no hay un efecto significativo sobre los MΦ múridos de la línea J774, demostrando que las indenoquinolinas ensayadas tienen un efecto selectivo sobre el parásito.

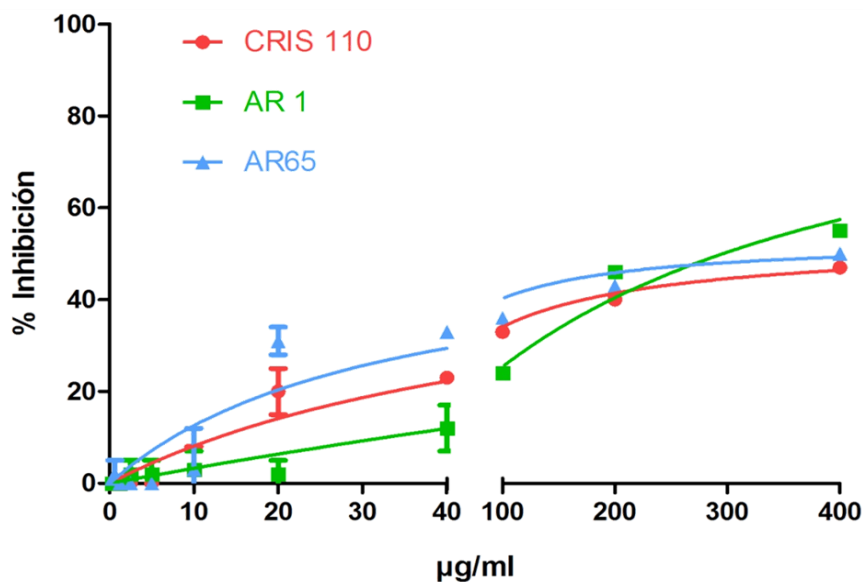


Figura 16 Curvas dosis-respuesta de CRIS 110, AR1 Y AR65 sobre Macrófagos móridos de la línea celular J774. Se representa el % de inhibición celular vs la concentración del compuesto en µg/ml. Los datos son el producto de 2 ensayos realizados por triplicado.

4.6 Efecto de las indeno quinolinas sobre amastigotes.

Se infectaron los macrófagos móridos de la línea J774 con el parásito alcanzando un 98% de infección, a continuación se incubaron con los compuestos a una concentración de 10µg/ml, valor mayor que los IC₅₀ de las indenoquinolinas CRIS 110, AR 1 y AR 65 obtenidos en los ensayos con los promastigotes pero con el cual no se observó un efecto apreciable de estos compuestos sobre los macrófagos. El número de amastigotes por macrófago a las 48 y 72 horas de tratamiento se muestran en la figura 17. El análisis de los resultados mediante la prueba t de Student mostró una diferencia significativa entre los valores promedio de las condiciones control y bajo tratamiento con las indenoquinolinas, siendo la diferencia extremadamente significativa ($P < 0,0001$) a las 72 horas.

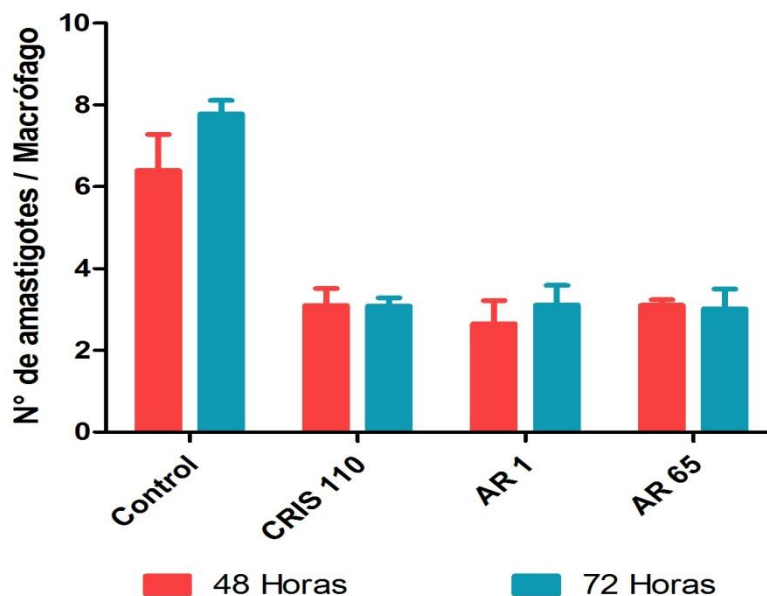


Figura 17 Efecto de CRIS 110, AR1 Y AR65 sobre amastigotes de *L. mexicana* interiorizados en Macrófagos múridos de la línea celular J774. Se representa el número de amastigotes por macrófago a las 48 y 72 horas de incubación con 10 $\mu\text{g}/\text{m}$ de los compuestos. Los datos son el producto de 1 ensayo realizado por triplicado.

Los resultados muestran el efecto de estas indenoquinolinas sobre la forma amastigote del parásito, resultando de interés seguir el estudio del efecto sobre la proliferación intracelular del amastigote a largo plazo y también evidenciar el proceso de internalización y el blanco terapéutico de estos compuestos, abriendo la posibilidad de proponer las indenoquinolinas como futuros candidatos alternativos para el tratamiento de la leishmaniasis.

5. Conclusiones.

- Entre las diez Indeno [2,1-c] quinolinas piridil sustituidas ensayadas, CRIS 110, AR1 y AR65 presentaron la mayor actividad citotóxica contra los promastigotes de *Leishmania mexicana* (IC_{50} de 0,2; 2,44 y 3,7 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente), comparable a la de los fármacos comerciales disponibles para el tratamiento de la leishmaniasis (Anfotericina B y Miltefosina). El efecto citotóxico se mantiene durante 72 horas.
- Las Indenoquinolinas CRIS 110 y CRIS 119 inducen en los promastigotes cambios morfológicos y alteraciones en la progresión del ciclo celular mientras que AR1 y AR65 generan formas redondeadas del parásito
- Las indenoquinolinas CRIS 110, AR1 y AR65 generan la pérdida del potencial transmembrana mitocondrial, mostrando que estos compuestos ejercen un probable efecto inductor de la apoptosis en los promastigotes.
- Las indenoquinolinas CRIS 110 y AR 65 combinadas con AR1 resultan en un efecto sinérgico sobre la forma promastigote.
- El efecto citotóxico de las indenoquinolinas CRIS 110, AR1 y AR65 sobre los macrófagos murchidos de la línea J774 no es significativo a las IC_{50} encontradas para los promastigotes, demostrando el efecto selectivo de estos compuestos hacia el parásito.
- CRIS 110, AR 1 Y AR 65 ejercen un efecto sobre la proliferación de amastigotes intracelulares, este efecto se mantiene al menos por 72 horas.

- Los resultados permiten considerar a CRIS 110, AR1 y AR65 como candidatos para continuar evaluando su potencial aplicación como agentes terapéuticos contra la leishmaniasis.

6. Anexo

Valores de IC₅₀ en µM, obtenidos para promastigotes de *Leishmania mexicana* incubados durante 48 horas.

Compuesto	IC ₅₀ (µM)	Sustitución	Compuesto	IC ₅₀ (µM)	Sustitución
CRIS 110	0,64±1,21	R2	AR 60	26,74±1,22	R4
CRIS 119	5,72±1,26	R2	AR 61	17,48±1,19	R2, R4
AR 1	7,48±1,10	R2	AR 62	97,55±2,11	R1, R4
AR 57	16,33±2	R2	AR 65	10,88±1,18	R2
AR 59	14,72±1,7	R4	AR 66	37,54±1,31	R2
Anfotericina B	0,05±1,24	-	Miltefosina	4,81±1,4	-

7. Bibliografía

- Aparicio, P., Rodríguez, E., Gárate, T., Molina, R., Soto, A., Alvar, J. 2003. Terapéutica antiparasitaria. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **21**: 579-594.
- Balaña-Fouce R., Reguera R.M., Cubría J.C. y Ordóñez D. 1998. The Pharmacology of Leishmaniasis. *Gen Pharmac.* **30**: 435-443.
- Barreca, G.S., Berlinghieri, M.C., Foti, F., Matera, G., Foca, A. 1997. Microscopic Observation of Progressive Immobilization of *Leishmania* Promastigotes in Acridine Orange Stain. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1867-1869.
- Berman, J.D., Waddell, D., Hanson, B.D. 1985. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Ch.* **27**: 916-920.
- Berman, J.D. 1996. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Clin. Dermatol.* **14**:519-522.
- Beverley, S.M., Coderre, J.A., Santi, D.V., Schimke, R.T. 1984. Unstable DNA amplification in methotrexate resistant *Leishmania* consists of extrachromosomal circles which relocate during stabilization. *Cell.* **38**:431-439.
- Borst, P., Oullette, M. 1995. New mechanism of drugs resistance in parasitic protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.* **49**:427-460.
- Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol* **106**: 290-302.

- Chen, G.X., Meuller, C., Wendlinger, M., Zolg, J.W. 1987. Kinetic and molecular properties of the dihydrofolate reductase from pyrimethamine-sensitive and pyrimethamine-resistant clones of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.* **31**:430-437.
- Chou J.C., Chou T.C. y Taladay P. 1984. Conservation of laboratory animals by improved experimental design, generalized equations and computer analyss. *Fed Proc.* **43**:576
- Chou J.C. 1991 Quantitation of synergism and antagonism of two or more drug by computerized analysis, in Synergism and Antagonism in Chemotherapy (Chou TC and Rideout DC eds). 223-244, Academic Press, New York.
- Chou J.C., Martin. 2005. CompuSyn of drug combinations: PC software and user's guide: A computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC₅₀ and ED₅₀ and LD₅₀ values. Combo Syn, Paramus, New Jersey.
- Croft, S.L., Urbina, J.A., Brun, R., 1997. Chemotherapy of human *leishmaniasis* and *trypanosomiasis*. *London: CAB International*, United Kingdom, 245-247.
- Croft, S.L., Barrett, M.P., Urbina, J.A. 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends. Parasitol.* **21**:508-512.
- Croft, S.L., Sundar, S., Fairlamb, A. 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:111–126.
- Cunningham, A. 2002. Parasitic adaptive Mechanims in Infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology* **72**: 132-141.

- Davies, C., Reithinger, R., Campbell-Lendrum, D., Feliciangeli, D., Borges, R., Rodríguez, N. 2000. The epidemiology and control leishmaniasis in Andean countries. *Cad Saude Pública*. **16**: 925-50.
- De Lima, H., Borges, R., Escovar, J., Convit, J. 2010. Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007. *Bol. Mal. Salud Amb.* **5**:284-299.
- De Gopegui, M.R., Ruiz, R. 2003. Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. *Int. J. Dermatol.* **37**:801-814.
- Ellenbeger, T.E., Beverly, S.M. 1989. Multidrug resistance and conservative amplification of the H region in *L. major*. *J. Biol. Chem.* **264**:15094-15103.
- Escobar, P., Matu, S., Marques, C., Croft, S. L. 2002. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop.* **81**:151-157.
- Frearson, J. A., Wyatt, P. G., Gilbert, I. H., Fairlamb, A. H. Target assessment for antiparasitic drug discovery. *Trends Parasitol.* 2007. **23**: 589-595.
- Hall, L.R., Titus, R.G. 1995. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J. Immunol.* **155**:3501-3506.
- Hall, B.F., Joiner, K.A. 1991. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defenses. *Parasitol. Today.* **7**: 22-27.
- Heby, O., Persson, L., Rentala, M. 2007. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. *Amino Acids.* **33**:359-66.

- Hepburn, N.C., Siddique, I., Howie, A.F., Beckett, G.J., Hayes, P.C.1994. Hepatotoxicity of sodium stibogluconate therapy for American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**:453-455.
- Kluza, J., Lansiaux, A., Wattez, N., Mahieu, C., Osheroff, N., Bailly, C. 2000. Apoptotic Response of HL-60 Human Leukemia Cells to the Antitumor Drug TAS-103. *Cancer Res.* **60**: 4077-4084.
- Kouznetsov, V.V., Puentes, C.O., Bohorquez, A.R., Zacchino, S.A., Sortino, M., Gupta, M., Vazquez, Y. y colaboradores. 2006. A Straightforward Synthetic Approach to Antitumoral Pyridinyl Substituted 7*H* Indeno [2, 1-*c*] Quinoline Derivatives via Three-Component Imino Diels-Alder Reaction. *Lett. Org. Che.* **3**: 300-304.
- Kouznetsov, V.V., Vargas, L.Y., Leal, S.M., Mora, U., Coronado, C.A. Meléndez, C.M., Romero, A.R., y colaboradores. 2007. Target-Oriented Synthesis of Antiparasitic 2 Hetaryl Substituted Quinolines Based on Imino Diels-Alder Reactions. *Lett. in Drug Design & Discovery.* **4**: 293-296.
- Kouznetsov, V.V., Melendez, C. 2009. Búsqueda de nuevos agentes antipatozoarios selectivos. *Med. UNAB.* **12**:33-45.
- Limoncu, M.E., Balcioglu, I. C., Yereli, K., Ozbel, Y., Ozbilgin, A. 1997. A New Experimental In Vitro Culture Medium for Cultivation of *Leishmania* Species. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2430-2431.
- Magill, A.J. 1995. Epidemiology of the leishmaniasis. *Dermatol. Clin*; **13**:505-523
- Mesa, A., Molano, P., Seon, B. 2008. Síntesis y actividades leishmanicida y citotóxica *in vitro* de análogos 2-arilquinolinas. *Vitae.* **15**: 259-266.

- Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Oikawa, S., Kojima, M., Kawanishi, S. 2002. Mechanism of Apoptosis Induced by a New Topoisomerase Inhibitor through the Generation of Hydrogen Peroxide. *J. Biol. Chem.* **227**:30684-30689.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*; **65**: 55-63.
- Mollinedo, S. 2002. Manual práctico de tratamiento de la leishmaniosis Tegumentaria Americana. Unidad de Parasitología y Entomología INLASA. Primera Edición. La Paz, Bolivia.
- Muñoz D, Cardona D, Cardona A., Carrillo, L., Quinones, W., Echeverri, F., Veléz I. y colaboradores. 2006. Efecto de Hidrazona sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania panamensis* y una proteasa de cisteína parasitaria. *Vitae*. **13**:5-12.
- Muskus, C., Marín, M. 2002. Metacicloogénesis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. *Biochem. Sciences*. **27**: 527-533.
- Murray, H. 2001. Clinical and experimental advances in treatment in visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**: 2185-2197.
- Murray, H., Berman, J., Davies, C., Saravia, N. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. **366**:1561-77.
- Olivier, M., Badaro, R., Medrano, F.J., Moreno, J. 2003. The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. **97**: 79-98.

- Paris, C., Loiseau, P.M., Bories, C., Breard, J. 2004. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **48**:852-859.
- Ponte-Sucre, A. 2003. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biol. Dis.* **28**:2-14.
- Ponte-Sucre, A., Vicik, R., Schultheis, M., Shirmeister, T., Moll, H. 2006. Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2439-47.
- Ponte-Sucre, A., Faber J.H., Gulder, T., Kajahn, I., Persen, S., Schultheis, M., Bringman, G. 2007. Activities of naphthylisoquinoline alkaloids and synthetic analogs against *Leishmania major*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:188-194.
- Roberts, C.W., McLeod, R., Rice, D.W., Ginger, M., Chance, M.L., Goad, L.J. 2003. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* **126**:129-142.
- Rodriguez, N.M., De Guglielmo, Z., Barrios, M.A., Barrios, R.M., Zerpa, O., Feliciangeli, M.D. 2005. Genetic homogeneity within *Leishmania (L.) infantum* isolated from human and dogs: the relationship with the sandfly fauna distribution in endemic areas of Nueva Esparta State, Venezuela. *Parasitol.* **130**: 611-619.

- Rojas, J., Solís, H., Palacios, O. 2010. Evaluación in vitro de la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. *An Fac med.* **71**:161-165
- Seifert, K., Croft, S. 2006. *In Vitro* and *In Vivo* Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 73-79
- Soto, J. y Soto, P. 2006. Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. *Biomédica* **26**:207-217
- Stoppani, A. 1999. Quimioterapia de la enfermedad de chagas. *Medicina.* **59**:147-165
- Tempone, A. G., Da Silva, A. C., Brandt, C. A., Martinez, F. S., Borborema, S. E., Da Silveira, M. A., De Andrade Jr, H. F. 2005. Synthesis and Antileishmanial Activities of Novel 3-Substituted Quinolines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **49**:1076-1080.
- Tremblay, M., Oliver, M., Bernier, R. 1996. *Leishmania* and the pathogenesis of HIV infection. *Parasitol Today*; **12**: 257-261.
- Upadhayaya, R.S., Shinde, P.D., Kadam, S.A., Bawane, A.N., Sayyed, A.Y., Kardile R.A, Gitay, P.N. y colaboradores. 2011. Synthesis and antimycobacterial activity of prodrugs of indeno[2,1-c]quinoline derivatives. *European J. Med. Chem.* **46**:1306-1324.
- Vercesi, A. E., Docampo, R. 1992. Ca^{2+} transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca^{2+} , pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential *in situ*. *Biochem. J.* **284**:463-467.

- Vercesi, A. E., Rodrigues, C. O., Catisti, R., Docampo, R. 2000. Presence of a Na^+/H^+ exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. *FEBS Lett.* **473**:203-206.
- Vélez I., López L. Sánchez, X., Mestra, L., Rojas, C., Rodríguez, E. 2010. Efficacy of Miltefosine for the Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**:351-356
- Welburn, S.C., Lillico, S., Murphy, N.B. 1999. Programmed cell death in procyclic form *Trypanosoma brucei rhodesiense*: identification of differentially expressed genes during Con A induced death. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**:229-234.
- Wheeler, R.J., Gluenz, E., Gull, K. 2011. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol. Microbiol.* **79**: 647-662.
- Wolfson J.S. Mchugh G. L. Swartz, M.N., Ng, E.Y.W., Hopper, D. C. 1987. Visualization of the mitochondrion-kinetoplast in viable *Trypanosoma cruzi* with rhodamine 123. *J. Parasitol.* **73**: 866-869.
- Wilson W. D., Tanious F. A., Mathis, A., Tevis, D., Hall, J.E., Boykin, D.W. 2008. Antiparasitic compounds that target DNA, *Biochimie.* **90**: 999-1014.
- Zerpa, O., Convit, J. 2009. Leishmaniasis Cutánea Difusa En Venezuela. *Gaz. méd. Bahia.* **79**:30-34

Consultas en línea:

- Division of Parasitic Diseases and Malaria. Consultado el 02 de Marzo del 2011 http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.htm
- Richard Wheeler-Science and illustration. Consultado el 14 de Octubre del 2011. <http://www.richardwheeler.net/contentpages/index.php>
- Look for Chemicals. Consultado el 31 de Enero del 2012.
<http://www.lookchem.com/cas-533/5330-29-0.html>
- Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires. Seminario de Tinciones. Consultado en Diciembre del 2011.
<http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm>