



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Efecto de las 7-cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas sobre *Leishmania mexicana*

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre

Universidad Central de Venezuela

Por el bachiller **Carlos Luis Torrealba Ordaz**

Como requisito parcial para optar al título

De licenciado en Biología

Tutora: Dra. Elizabeth Valdivieso

Caracas, Venezuela

Abril, 2015

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elizabeth Valdivieso por abrirme las puertas del laboratorio y brindarme la oportunidad de poder realizar mi trabajo especial de grado bajo su tutela. Gracias por su disposición en resolver todas mis dudas y hacerme crecer tanto personal como académicamente.

Al Dr. Gustavo Benaim por donar gentilmente el fármaco miltefosina, así como todo el grupo de trabajo del Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos del Instituto de Estudios Avanzados, quienes me brindaron gran apoyo al momento de realizar los ensayos correspondientes a la determinación del potencial electroquímico mitocondrial y alcalinización de los acidocalcisomas.

Al Dr. Francisco Arvelo y al Lic. Felipe Sojo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del IBE, por el apoyo y la colaboración al desarrollo de este trabajo. En especial por las drogas suministradas y el asesoramiento en el cultivo de macrófagos.

A la Dra. Francehuli Dagger, por su dedicación y disposición en aclarar todas las dudas que surgieron a lo largo de la realización de este trabajo de investigación con respecto al cultivo de macrófagos y parásitos así como las técnicas de tinción utilizadas en este trabajo.

A Fabiola Mejías, mi compañera de trabajo por su eterna ayuda, disposición a colaborar y paciencia en todos los ensayos realizados.

A la Dra. Ana K. Marcano, por enseñarme todo lo referente al trabajo con cultivos de parásitos y su valioso apoyo y colaboración en la elaboración de los reactivos utilizados.

A la Dra. Carolina Bernal, por ayudarme en la redacción y corrección de este trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Fisiología y Biofísica y al Laboratorio de Fisiología y Genética de Microorganismos por permitirme utilizar las veces que fueron necesarias su microscopio óptico para realizar el conteo de macrófagos infectados.

A mis padres y hermano por toda su ayuda brindada sin los cuales este trabajo hubiese sido más difícil de realizar.

A todas las personas e instituciones que ayudaron de alguna u otra manera a la elaboración de este trabajo de investigación.

RESÚMEN

En el presente estudio evaluamos el efecto de dos compuestos quinolínicos, FR25 ($C_{17}H_{12}ClNO_3$) y FR95 ($C_{18}H_{15}ClN_4O_2S$), de la serie 7-cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas, derivados de metabolitos secundarios de la planta *Eugenia cariophyllus*, sobre *Leishmania mexicana*. Los resultados obtenidos demuestran que estos compuestos son capaces de inhibir de forma dosis dependiente la proliferación de los promastigotes de *L. mexicana*, con valores de IC_{50} de $8,93\mu M$ para FR25 y de $16,12\mu M$ para FR95. En presencia de las quinolinas, los promastigotes mostraron alteraciones asociadas a su morfología, desde una forma alargada y flagelada, característica de este morfotipo, hasta una forma irregular y con múltiples flagelos. Una vez establecido el efecto de las drogas sobre los promastigotes estas fueron evaluadas sobre macrófagos múridos de la línea celular J774, previamente infectados con amastigotes, observándose una marcada reducción del porcentaje de infección y del número de amastigotes presentes en las vacuolas parasitóforas. Cabe destacar que el estadio amastigote fue más susceptible al tratamiento con las drogas con valores de IC_{50} de $2,19\mu M$ para FR25 y de $1,15\mu M$ para FR95. Asimismo, no se observó un efecto citotóxico significativo de estos compuestos sobre la línea celular de macrófagos a las concentraciones ensayadas. Por último, se evaluó la combinación de los compuestos FR25 y FR95 con la miltefosina, un fármaco comercial para el tratamiento de leishmaniasis, sobre ambos morfotipos del parásito. Los resultados muestran un efecto sinérgico para ambas combinaciones, con valores del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) de 0,61 para MTF: FR25 y de 0,56 para MTF: FR95 sobre los promastigotes y valores de FIC de 0,36 para MTF: FR25 y 0,35 para MTF: FR95 sobre los amastigotes. El presente trabajo valida la combinación de drogas como una alternativa eficiente al potenciar el efecto de compuestos anti-*Leishmania* y señala a los compuestos quinolínicos aquí estudiados como posibles drogas leishmanicidas.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Leishmaniasis.....	1
1.2. Tratamientos actuales contra la leishmaniasis.....	2
1.3. Componentes bioactivos en plantas.....	7
1.4. Quinolinas.....	8
1.5. Combinaciones de compuestos.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo general.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. METODOLOGÍA.....	13
3.1. Cultivo Celulares.....	13
3.1.1. Cultivo de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	13
3.1.2. Cultivo de macrófagos múridos de la línea celular J774.....	13
3.2. Compuestos.....	13
3.3. Efecto de los compuestos quinolínicos sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	14
3.4. Efecto de FR25 y FR95 sobre la morfología de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	15
3.5. Ensayo de citotoxicidad de FR25 y FR95 sobre macrófagos múridos de la línea celular J774.....	15
3.6. Infección de macrófagos múridos de la línea celular J774 por promastigotes de <i>L. mexicana</i>	16
3.7. Efecto de los compuestos quinolínicos FR25 y FR95 sobre el porcentaje de infección de macrófagos múridos por amastigotes de <i>L. mexicana</i>	16
3.8. Efecto de FR25 y FR95 en combinación con la miltefosina sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	17
3.9. Efecto de FR25 y FR95 en combinación con la miltefosina sobre amastigotes intracelulares de <i>L. mexicana</i>	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1. Efecto de los compuestos quinolínicos sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	19
4.2. Efecto de los compuestos FR25 y FR95 sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	19
4.3. Efecto de los compuestos FR25 y FR95 sobre la morfología de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	21

4.4. Citotoxicidad de FR25 y FR95 sobre los macrófagos múridos de la línea celular J774.....	23
4.5. Efecto de FR25 y FR95 sobre el porcentaje de infección de macrófagos múridos por amastigotes de <i>L. mexicana</i>	24
4.6. Efecto de FR25 y FR95 en combinación con la miltefosina sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	28
4.7. Efecto de FR25 y FR95 en combinación con la miltefosina sobre el porcentaje de infección de macrófagos múridos por amastigotes intracelulares de <i>L. mexicana</i>	29
5. DISCUSIÓN.....	33
6. CONCLUSIONES.....	42
7. BIBLIOGRAFÍA.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema general del ciclo de vida de *Leishmania sp.*, en el hospedador humano. (Tomado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx> 10/01/2014)..... 2
- Figura 2.** Estructura de los compuestos 7-cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas. 11
- Figura 3. Fórmula descrita por Hallander y col. (1982) para el cálculo de los valores del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC)..... 18
- Figura 4.** Efecto del compuesto (A) FR25 y (B) FR95 sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*. Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes. 20
- Figura 5.** Efecto de FR25 y FR95 sobre la morfología de promastigotes de *L. mexicana*. (A) Control; (B) DMSO; (C) FR25 9µM; (E) FR25 15µM; (D) FR95 16µM (F) FR95 20 µM 22
- Figura 6.** Efecto citotóxico del compuesto FR25 sobre macrófagos múridos de la línea celular J774.. 23
- Figura 7.** Efecto citotóxico del compuesto FR95 sobre macrófagos múridos de la línea celular J774.. 24
- Figura 8.** Efecto de los compuestos FR25 (A) y FR95 (B) sobre el porcentaje de infección de macrófagos múridos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. mexicana*. 26
- Figura 9.** Efecto de FR25 y FR95 sobre el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes de *L. mexicana*. (A) Control sin infectar; (B) Control infectado; (C) 1µM FR25; (E) 6µM FR25; (G) 10µM FR25; (D) 1µM FR95; (F) 6µM FR95; (H) 10µM FR95. Las flechas negras indican presencia de amastigotes y las flechas rojas indican vacuolas vacías. (100X)..... 27
- Figura 10.** Isoblograma de la combinación de MTF:FR25 sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación de MTF:FR25. Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes. 28
- Figura 11.** Isoblograma de la combinación de MTF:FR95 sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación de MTF:FR95. Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes. 29
- Figura 12.** Efecto de FR25 y FR95 en combinación con la miltefosina sobre amastigotes intracelulares de *L. mexicana*. (A) Control sin infectar; (B) Control infectado; (C) 0,5µM MTF + 3µM FR25; (E) 2µM MTF + 1µM FR25; (G) 1µM MTF + 2µM FR25; (D) 0,5µM MTF + 3µM FR95; (F) 2µM MTF + 1µM FR95; (H) 1µM MTF + 2 µM FR95. Las flechas negras indican presencia de amastigotes y las flechas rojas indican vacuolas vacías. (100X). ... 31

Figura 13. Isoblograma de la combinación de MTF:FR25 (A) y MTF:FR95 (B) sobre el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes de *L. mexicana*. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación. Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes. 32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Drogas utilizadas en el tratamiento de la Leishmaniasis. (Modificado de Herwaldt, 1999).	5
Tabla 2. Compuestos sintéticos con actividad Anti- <i>Leishmania</i> (Monzonte, 2009).	6
Tabla 3. Combinación de los compuestos FR25 y FR95 con la miltefosina sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i>	17
Tabla 4. Combinación de los compuestos FR25 y FR95 con la miltefosina sobre amastigotes intracelulares de <i>L. mexicana</i>	18
Tabla 5. Porcentaje de inhibición de los compuestos quinolínicos sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	19
Tabla 6. Efecto de los compuestos FR25 y FR95 sobre el porcentaje de infección de macrófagos de la línea celular J774 con amastigotes de <i>L. mexicana</i>	25

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADP: Adenosina difosfato.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ATP: Adenosina Trifosfato.

COL: Colaboradores.

DMSO: Dimetil-sulfoxido.

FIC: Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional.

IC₅₀: Concentración inhibitoria del 50% de la población celular.

LC: Leishmaniasis cutánea.

LMC: Leishmaniasis mucocutánea.

LV: Leishmaniasis visceral.

MIC: Concentración Mínima Inhibitoria cercana al 90% de la población celular.

MTF: Miltefosina.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: Buffer Fosfato Salino.

SFB: Suero Fetal Bovino.

FR25: 7-cloroquinolina-4-oxifenil (2-metoxi-5-carboxialdehido).

FR95: 7-cloroquinolina-4-oxifenil (2-metoxi-5-tiocarbamida).

μM: Micromolar

mM: Milimolar

ml: Mililitro

mg: miligramos

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Leishmaniasis

La leishmaniasis pertenece a un grupo de enfermedades parasitarias causada por protozoarios del género *Leishmania*. Está caracterizada por su diversidad y complejidad, tanto en el número de especies causantes de la misma, como en la variedad de los síndromes asociados a estos (Piscopo y Mallia, 2006). Es considerada un problema importante de salud pública, provocando una significativa morbilidad y mortalidad en África, Asia y América Latina. La enfermedad amenaza actualmente a unos 350 millones de mujeres, hombres y niños en 88 países de todo el mundo, afectando principalmente a los países subdesarrollados o en vías de desarrollo (Organización Mundial de la Salud, 2010).

En humanos, diferentes especies del parásito, así como también la respuesta inmune del hospedador vertebrado, están asociadas a diversas manifestaciones de la enfermedad. Las principales formas clínicas de la leishmaniasis son: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV), siendo ésta última la forma letal de la enfermedad. Se estima que hay aproximadamente entre 200 y 400 mil nuevos casos de LV y 0,7 a 1,2 millones de nuevos casos de LC en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2010)

En Venezuela, esta parasitosis está ampliamente distribuida en todos los estados, tiene una prevalencia aproximada de 12,3 por cada 100.000 habitantes, siendo la más alta en los estados Lara, Trujillo, Mérida, Táchira, Sucre, Anzoátegui, Cojedes, Miranda y Yaracuy (Bonfante-Garrido y Barroeta, 2002; De Lima y col., 2011).

La leishmaniasis es transmitida por la picadura del insecto vector del género *Phlebotomus sp.* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia sp.* en el Nuevo Mundo. A lo largo de su ciclo de vida (figura 1) *Leishmania* pasa por dos morfotipos definidos; uno en el insecto

vector, donde los parásitos están en la forma de promastigotes, caracterizados por tener una forma alargada (15-24 μm x 2-4 μm) ser móviles y flagelados; y otro en los hospedadores vertebrados, donde el parásito se encuentra en la forma amastigote, de forma oval, con un tamaño de 2-3 μm e intracelular (Molyneux y Killick-Kendrick, 1987). Los promastigotes metacíclicos, inoculados por la picadura del insecto vector, son fagocitados por los macrófagos donde se diferencian a amastigotes, los cuales se replican dentro de los fagolisosomas hasta lisis la célula. (Araujo y col., 1998; Ashford, 2000).

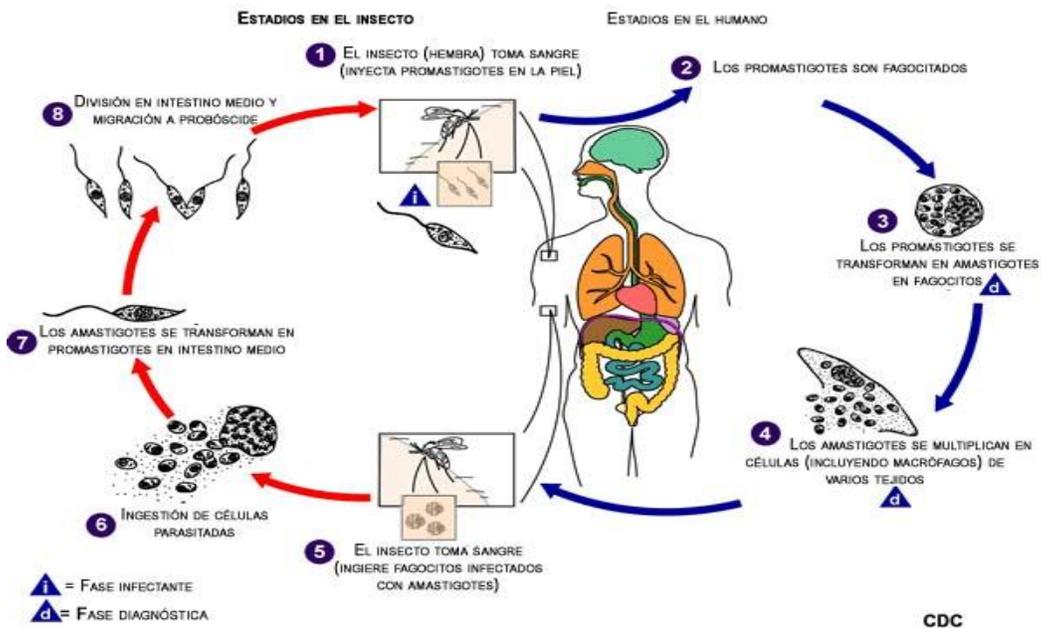


Figura 1. Esquema general del ciclo de vida de *Leishmania* sp., en el hospedador humano. (Tomado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx> 10/01/2014).

1.2. Tratamientos actuales contra la leishmaniasis

La escogencia de una quimioterapia idónea contra la leishmaniasis ha resultado difícil debido a la complejidad de la enfermedad. Diversos ensayos clínicos realizados han demostrado resultados variables según el estado nutricional e inmunológico del paciente,

la severidad de la enfermedad y la especie de *Leishmania* a tratar (Ramos y col., 1994; Herwalt, 1999). Más de 20 fármacos han sido propuestos para el tratamiento de la leishmaniasis. No obstante, los antimoniales pentavalentes (estibogluconato de sodio y antimoniato de meglumina) son considerados los tratamientos de primera línea, usados desde hace más de 70 años. El mecanismo de acción de estas drogas no se conoce con exactitud, sin embargo se ha demostrado que influyen sobre la bioenergética del parásito inhibiendo la glicolisis, la β -oxidación de los ácidos grasos y la fosforilación del ADP. Adicionalmente, se ha indicado que inhiben la tripanotión reductasa, causando una acumulación tanto de tripanotión como de glutatión (Wyllie y col., 2004).

Como tratamientos de segunda línea en los casos de resistencia o intolerancia a los antimoniales, se utilizan la anfotericina B, la pentamidina, la paromomicina y más recientemente la miltefosina (tabla 1). La anfotericina B es un antibiótico poliénico que se extrajo originalmente de la bacteria *Streptomyces nodosus* y se demostró su actividad contra *Leishmania* a principios de 1960 (Singh y Sivakumar, 2004). El mecanismo de acción de este fármaco se basa en su afinidad selectiva por el ergosterol, principal esteroide en *Leishmania*, lo cual altera la permeabilidad de la membrana del parásito, produciendo la formación de poros que resultan en la lisis celular (Ramos y col., 1996; Roberts y col., 2003). La anfotericina B tiene una excelente actividad leishmanicida y constituye una opción en los pacientes que mostraron resistencia al tratamiento con los derivados del antimonio. Aun cuando, los efectos tóxicos de la anfotericina B han disminuido en gran medida con el desarrollo de formulaciones lipídicas como el Ambiosome, la alta toxicidad sigue siendo, el factor limitante para su uso.

Otro de los fármacos utilizados en el tratamiento contra la leishmaniasis es la pentamidina, una diamidina aromática, que actúa sobre el genoma de *Leishmania* dificultando la replicación y la transcripción a nivel mitocondrial (Balaña-Fouce y col., 1998). Es uno de los fármacos utilizados para todas las manifestaciones clínicas de la

leishmaniasis. Sin embargo, investigaciones de Andersen y col. (2005) reportan un porcentaje de recuperación bajo (35%) para ciertas especies de *Leishmania*. Por otro lado, el aminoglucósido paromomicina, es eficaz contra un gran número de protozoarios, incluyendo *Leishmania spp.* (Neal, 1968). Aunque el mecanismo de acción de este antibiótico en *Leishmania sp.* no se conoce completamente, se piensa que es similar al ejercido en bacterias, donde se une al sitio A del ribosoma provocando errores en el proceso de traducción proteica (Sundar y Chakravarty, 2008). Al igual que los otros fármacos, la paromomicina produce severos efectos secundarios, siendo los más comunes la ototoxicidad y la disfunción hepática (Sundar y col., 2007).

Por otro lado, se encuentra la miltefosina, un fosfolípido acilado análogo a la fosfocolina, que afecta las rutas de señalización celular e inhibe las enzimas implicadas en la síntesis de los fosfolípidos de la membrana celular (Verma y Dey, 2004). Adicionalmente, también se reportó que la miltefosina es capaz de alterar la homeóstasis intracelular del Ca^{+2} de *L. mexicana* (Serrano y col., 2009b). A pesar de ser una droga de administración oral, con la que se han obtenido resultados en la disminución de la carga parasitaria en pacientes con leishmaniasis, este fármaco es altamente teratogénico y se han reportado recaídas de la enfermedad en un número significativo de pacientes tratados (Monzote, 2009).

Algunos agentes antifúngicos como los imidazoles y triazoles han mostrado clínicamente un fuerte efecto antiproliferativo en el parásito, en particular los compuestos itraconazol y posaconazol, los cuales inhiben la 14 α -dimetilasa, enzima clave en la ruta de la biosíntesis del esteroles, afectando la membrana celular de *Leishmania sp.* sugiriendo que estas drogas podrían representar nuevas alternativas para el tratamiento de la leishmaniasis. (Alrajhi y col., 2002; De Macedo-Silva y col., 2013).

Tabla 1. Drogas utilizadas en el tratamiento de la Leishmaniasis. (Modificado de Herwaldt, 1999).

Fármaco	Vía de administración	Síndrome	Dosis	Comentarios
Alternativas parentales				
Antimoniales pentavalentes	Intravenosa o intramuscular	LV LC LM	20 mg/kg diario por 28 días 20 mg/kg diario por 20 días 20 mg/kg diario por 28 días	Reacciones adversas dolor en el sitio de la inyección, síntomas gastrointestinales, mialgias, dolores articulares, trastornos electrocardiográficos toxicidad renal
Anfotericina B (desoxicolato)	intravenosa	LV LC LM	0,5-1 mg/kg 4 veces al día hasta un total de 20 mg/kg	Efectos que ocasiona: fiebre, escalofríos, cefalea náusea, vómitos, convulsiones, estribor respiratorio y modesta hipotensión
Anfotericina B liposoma	Intravenosa	LV LC LM	2,5 mg/Kg diarios hasta un total de 15-21 mg/Kg	Efectos secundarios: escalofríos, fiebre, náuseas, cefalea, hipopotasemia, hiperbilirrubina, trombocitopenia
Pentamidina isetionato	Intravenosa o intramuscular	LV LC LM	4 mg/Kg por día de por día de por medio o 3 veces por semana hasta 15-30 dosis 3 mg/Kg por día de por medio 2-4 mg/Kg por día de por medio o 3 veces por semana hasta 15 dosis	Ocasiona reacciones como: taquicardia, mareo, cefalea, vómitos, tromboflebitis, trombocitopenia, anemia, elevación de las enzimas hepáticas, neurotoxicidad, pancreatitis e hipoglicemias
Paromomicina sulfato	Intravenosa o intramuscular	LV LC	15-20 mg/Kg diario por 21 días	Los efectos colaterales están limitados al potencial nefrotóxico y ototóxico, adema esta reportado dolor local en el sitio de la inyección
Alternativas orales				
Miltefosina	oral	LC	100-150 g por día durante 28 días	Los efectos reportados son vómitos, diarrea. Es teratogénico
Ketoconazol	oral	LC	600 mg diarios por 28 días	Muy efectivo para <i>L. panamensis</i> y <i>L. mexicana</i> y posiblemente para <i>L. major</i> . Entre los efectos adversos más comunes incluyen náuseas, vómitos,
Itraconazol	oral	LC	200 mg dos veces al día por 28 días	Utilizado para casos originados por organismos del subgénero Viana particularmente <i>L. panamensis</i>
Alopurinol	Oral	LC	30 mg/Kg en una o dos dosis diarias por 30 días	Produce cefalea, dolor abdominal, urticarias
Alternativas locales o tópicos				
Paromomicina sulfato	Intralesional	LC	2 veces diarias por 10-20 días	Considerada específica para <i>L. major</i> <i>L. mexicana</i>
Antimoniales pentavalentes	Intralesional	LC	Una inyección por semana	Síntomas locales

Tal como se ha venido describiendo, podemos notar que en su mayoría, los fármacos utilizados actualmente en el tratamiento de la leishmaniasis son poco efectivos contra esta patología, producen efectos secundarios severos e inducen resistencia. Bajo esta premisa, se hace necesario el desarrollo de nuevas líneas de investigación alternativas orientadas a la búsqueda de blancos terapéuticos, para el desarrollo de quimioterapias más eficaces (Borst y Ouellete, 1995; Croft y Yardley, 2002). En los últimos años se ha explorado el diseño de inhibidores específicos sobre moléculas de las vías bioquímicas y metabólicas esenciales para la supervivencia del parásito, como un posible medio para controlar esta parasitosis (Rojas y col., 2006; Pérez-Victoria y col., 2006). Al respecto, Monzote (2009) propone en su investigación, que las enzimas diana de estas vías bioquímicas en el parásito deben tener diferencias estructurales y funcionales significativas a las de sus homólogas en mamífero, para así lograr una inhibición selectiva. En tal sentido, se han evaluado los efectos de una gran variedad de moléculas sintéticas dirigidas contra blancos específicos del parásito (tabla 2), encontrándose entre los blancos más idóneos a las topoisomerasas del cinetoplasto, la tripanotión reductasa, la cistein proteasa entre otras (Monzote, 2009).

Tabla 2. Compuestos sintéticos con actividad Anti-*Leishmania* (Monzote, 2009).

Compuesto	Efecto del Fármaco	Actividad Anti- <i>Leishmania</i>
3-quinolinas sustituidas	Potente activador de macrófagos	Efecto <i>in vitro</i> contra promastigotes y amastigotes de <i>L. chagasi</i>
9,9-diametilxantina tricíclica	Inhibidor de la tripanotión reductasa	Causa inhibición <i>in vitro</i> de la proliferación de promastigotes y amastigotes de <i>L. chagasi</i>
Azasteroles	Inhibidor de la 24-metiltransferasa	Muestra actividad inhibitoria del crecimiento contra promastigotes y amastigotes axénicos de <i>L. amazonensis</i>
Edelfosina	Nuevo derivado de alquil-fosfolípido	Alta actividad <i>in vitro</i> contra promastigotes y amastigotes de <i>L. donovani</i>
N-acetil-l-cisteína	Precursor de glutatión	Muestra actividad <i>in vivo</i> contra <i>L. infantum</i> en ratones BALB/c
Nicotinamida	Inhibidor de la certain III NAD	Inhibe la proliferación de promastigotes y amastigotes de <i>L. infantum</i>
Perifosina	Nuevo derivado de alquil-fosfolípido	Significativa actividad antiproliferativa contra promastigotes de <i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. major</i> , y <i>L. infantum</i>
Triazoles	Inhibidor de la ruta biosintética del ergosterol	Actividad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> contra <i>L. amazonensis</i> y <i>L. donovani</i>

1.3. Componentes bioactivos en plantas

Además de los tratamientos con drogas sintéticas descritos anteriormente, se están llevando a cabo estudios dirigidos a la búsqueda de nuevos fármacos leishmanicidas más potentes y menos tóxicos. Una de las estrategias consiste en la búsqueda de compuestos bioactivos aislados de plantas los cuales han demostrado tener un amplio rango de acción contra distintas patologías (Brito y col., 2013).

Los extractos de plantas han sido utilizados empíricamente desde hace siglos en el tratamiento de diversas patologías infecciosas. La naturaleza ha proporcionado un número importante de metabolitos secundarios y componentes bioactivos, que fueron empleados por la industria farmacéutica entre 1981 y 2006 para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades. Al menos, 1.184 nuevos fármacos han sido registrados en ese período, de los cuales el 28% son derivados de productos naturales. En este sentido, la búsqueda de compuestos bioactivos en plantas es un buen punto de partida para identificar productos naturales con acción anti-*Leishmania* (Brito y col., 2013).

Con base en el conocimiento etnomédico de poblaciones locales, en las últimas décadas se han iniciado estudios con diferentes extractos de plantas para evaluar su potencial leishmanicida (Rocha y col., 2005). A partir de los extractos con actividad antiparasitaria, se realizaron estudios fitoquímicos con la finalidad de identificar los posibles compuestos que pueden ser propuestos como agentes anti-*Leishmania* y evaluar su potencialidad como tratamiento contra esta enfermedad. Un gran número de extractos de diferentes plantas han presentado actividad antiproliferativa y su análisis fitoquímico mostró una gran diversidad de grupos funcionales entre los que se destacan: los alcaloides, las flavonoides, las quinonas, los fenoles, los taninos, los cardenólidos, los esteroides y las saponinas (Inostroza y col., 2011).

1.4. Quinolinas

Entre los compuestos extraídos de plantas que han sido evaluados en diferentes ensayos contra infecciones parasitarias, encontramos a las quinolinas, compuestos heterocíclicos aromáticos, formados por una estructura de doble anillo, que contiene un núcleo derivado del benceno y uno anillo de piridina. El miembro más simple de la familia es la quinolina, un compuesto con estructura molecular C_9H_7N . Varios derivados de quinolina, aislados de plantas o preparados sintéticamente, han presentado una notable actividad medicinal, siendo utilizados como drogas para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades (Dorey y col., 2002; Vangapandu y col., 2004).

Los primeros reportes donde se describe la actividad antiparasitaria de las quinolinas, corresponden a la extracción de la quinina, una quinolina obtenida de la planta del género *Cinchona*, la cual ha sido utilizada en el tratamiento del paludismo desde hace más de 200 años (Levy y Azoulay, 1994). Posteriores modificaciones de este compuesto dieron lugar a otros fármacos con uso terapéutico contra esta enfermedad, como la cloroquina y la primaquina. Estos compuestos siguen siendo las drogas más efectivas contra esta parasitosis en la actualidad (Tekwani y Walker, 2006).

A partir de estos estudios, la estructura de los compuestos quinolínicos, se ha empleado como base para el diseño de diferentes compuestos sintéticos con diversas propiedades farmacológicas entre las que destacan: antioxidantes (Dorey y col., 2002), antimicobacteriales (Vangapandu y col., 2004) y antitumorales (Zhao y col., 2005).

En el caso específico de *Leishmania*, se han sintetizado una gran variedad de compuestos tomando como base la estructura de las quinolinas, las cuales han mostrado inhibición del crecimiento del parásito. Entre estas quinolinas encontramos las tetrahydroquinolinas, las esterilquinolinas y las indenoquinolinas (Kouznetsov y col., 2007; Mesa y col., 2008), las cuales han mostrado *in vitro* actividad antiproliferativa en

promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania spp.* Un estudio reciente de Bompert y col. (2013) reporta que la familia de las fenilquinolinas fueron capaces de inhibir *in vitro* la proliferación de promastigotes y amastigotes de *L. braziliensis* en macrófagos murchidos. Estos autores proponen la alteración de la bioenergética de los parásitos, mediante la interrupción de potencial electroquímico mitocondrial, como el mecanismo de acción de estos compuestos.

Otro derivado de las quinolinas que ha mostrado efectos inhibitorios contra *Leishmania spp* es la sitamaquina, una 8-amino-quinolina. Este es un fármaco activo por vía oral, que causa una disminución rápida y significativa de los niveles de ATP del parásito, lo que conduce a su colapso bioenergético (Carvalho y col., 2011). Ensayos clínicos de la sitamaquina contra la LV en la India (Jha, 2005) y Kenia (Wasunna, 2005) mostraron una disminución de la carga parasitaria en pacientes infectados con *Leishmania spp.* Sin embargo, este compuesto produce efectos secundarios severos, tales como disfunción renal, por lo cual se requiere de una mayor investigación para proponerlo como tratamiento alternativo contra la leishmaniasis.

1.5. Combinaciones de compuestos

El uso de terapias de combinación, utilizando fármacos de distinta estructura química y mecanismo de acción, constituye actualmente una estrategia alternativa para abordar el difícil reto de conseguir mejores tratamientos para la leishmaniasis (Van Griensven y col., 2010). Ensayos *in vitro* e *in vivo* de combinaciones de drogas han mostrado efectos sinérgicos, potenciando la actividad antiparasitaria.

Estudios pioneros sobre combinación de drogas fueron realizados por Chungue y col. (1990) y Neal y col. (1995) quienes evaluaron en ensayos clínicos, el efecto del estibogluconato de sodio en combinación con la paromomicina y el alopurinol,

encontrando que con estas combinaciones de fármacos los pacientes se recuperaban más rápido y no sufrían recaída en un periodo de 12 meses.

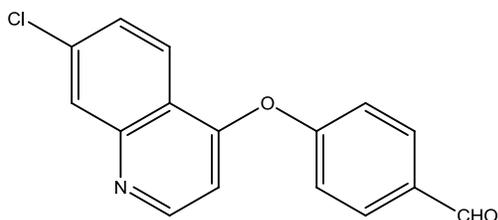
A partir los trabajos de Chunge y col. (1990) y Neal y col. (1995) varios grupos de investigación evaluaron la combinación de diferentes fármacos leishmanicidas como una alternativa terapéutica. Seifert y Croft (2006) demostraron que las combinaciones entre miltefosina/anfotericina B y miltefosina/paromomicina tienen un efecto sinérgico antiproliferativo en promastigotes y amastigotes de *Leishmania*. Con el fin de ampliar aún más la información sobre combinaciones de fármacos efectivas contra este parásito protozoario, Seifert y col. (2011) también evaluaron la combinación de la sitamaquina con la anfotericina B, la miltefosina, la pentamidina y la paromomicina, encontrando que en amastigotes de *L. donovani* la única combinación que tuvo un efecto sinérgico fue la sitamaquina/pentamidina.

Por otra parte, Serrano y col. (2009a), encontraron que la amiodarona, agente antiarrítmico que afecta la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, presentó un efecto sinérgico con la miltefosina sobre amastigotes intracelulares de *L. mexicana*. Esta combinación produjo un 90% de cura parasitológica en un modelo murino de leishmaniasis (Serrano y col., 2009b).

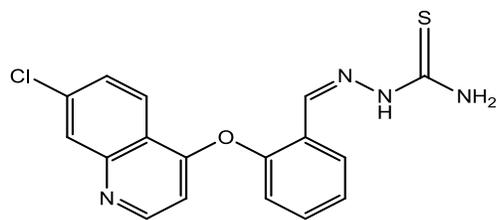
Los diferentes estudios de sinergismo proporcionan un nuevo enfoque experimental para identificar tratamientos alternativos de mejor eficacia contra la leishmaniasis, utilizando fármacos existentes contra este parásito en combinación con nuevos compuestos que han mostrado tener una actividad antiproliferativa del mismo.

Debido al efecto obtenido de los compuestos derivados de extractos de plantas reportado en la literatura y la potenciación de fármacos en la terapia de combinación de drogas para el tratamiento de la leishmaniasis, el Laboratorio de Biología Celular de Parásitos se interesó en estudiar el efecto de las 7-cloroquinolinas-4-oxifenil sustituidas (figura 2), compuestos semisintéticos derivados de diversas modificaciones de

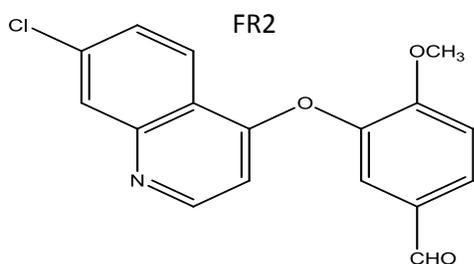
cicloación del eugenol extraído del aceite esencial de *Eugenia caryophyllus*, sobre *Leishmania mexicana*.



Chemical Formula: $C_{16}H_{10}ClNO_2$
Molecular Weight: 283,71

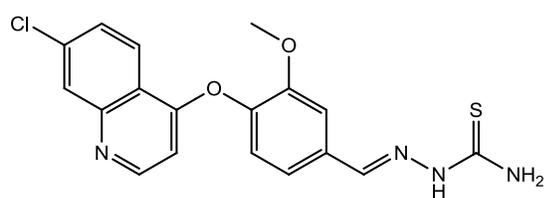


Chemical Formula: $C_{17}H_{13}ClN_4OS$
Molecular Weight: 356,83



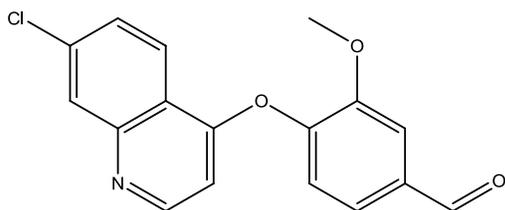
Chemical Formula: $C_{17}H_{12}ClNO_3$
Molecular Weight: 313,74

FR24



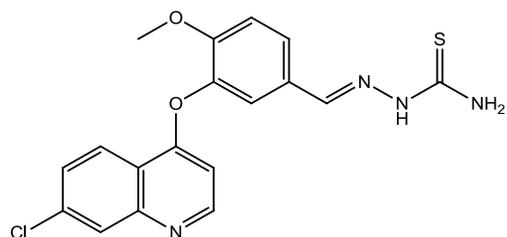
Chemical Formula: $C_{18}H_{15}ClN_4O_2S$
Molecular Weight: 386,86

FR95



Chemical Formula: $C_{17}H_{12}ClNO_3$
Molecular Weight: 313,74

FR25



Chemical Formula: $C_{18}H_{15}ClN_4O_2S$
Molecular Weight: 386,86

FR96

Figura 2. Estructura química de los compuestos 7-cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de las 7-cloroquinolinas-4-oxifenil sustituidas sobre *L. mexicana*.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los compuestos quinolínicos sobre:
 - La proliferación de promastigotes de *L. mexicana*.
 - La morfología de promastigotes de *L. mexicana*.
 - La viabilidad de macrófagos múridos de la línea celular J774.
 - El porcentaje de infección de macrófagos múridos de la línea celular J774 por *amastigotes de L. mexicana*.
- Evaluar el efecto de la combinación de FR25 y FR95 con la miltefosina sobre la proliferación de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. mexicana*.

3. METODOLOGÍA

3.1. Cultivo Celulares

3.1.1. Cultivo de promastigotes de *L. mexicana*.

Se emplearon promastigotes de *L. mexicana* (cepa MHOM/BZ/82/BeI-21) suministrados por el Laboratorio de Biología Celular de Parásitos del Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, U.C.V. Los cultivos se mantuvieron *in vitro* en értulas estériles de 125 ml de capacidad a temperatura ambiente y sin agitación, cultivados en medio Schneider (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Paisley, UK) inactivado a 56°C.

El número de parásitos se determinó por el contaje directo de células, utilizando la cámara de Neubauer. Alternativamente se realizó una medida indirecta basada en la relación preestablecida entre la turbidez del cultivo (porcentaje de tramitancia) y el número de células/ml en un fotocolorímetro Spectronic 20.

3.1.2. Cultivo de macrófagos múridos de la línea celular J774.

Los macrófagos utilizados pertenecen a la línea celular J774 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado con 10% de SFB inactivado a 56°C, 1% de Penicilina/Estreptomicina y 2mM de L-glutamina, incubados en una cámara de crecimiento con atmósfera de CO₂ al 5% y a una temperatura de 37°C.

3.2. Compuestos

Los compuestos quinolónicos fueron sintetizados en el laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular de la Universidad Industrial de Santander de Colombia y fueron facilitados por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología de Experimental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de

Venezuela. Las quinolinas de la serie 7-cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas, son compuestos semisintéticos derivados de diversas modificaciones de cicloadición del eugenol que fue extraído del aceite esencial de *Eugenia caryophyllus*. La miltefosina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) fue donada por el Dr. Gustavo Benaim del Laboratorio de Señalización Celular, Instituto de Estudios Avanzados (IDEA).

Se prepararon soluciones stock de cada compuesto en el rango milimolar (mM) utilizando como disolvente dimetil-sulfoxido (DMSO), a partir del cual se tomaron alícuotas para llegar a una concentración determinada en el cultivo.

3.3. Efecto de los compuestos quinolínicos sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*

En értulas de 125 ml se colocaron $2,5 \times 10^6$ promastigotes de *L. mexicana* en 10ml de medio Schneider suplementado con 10% SFB, a los cuales se les agregaron las diferentes concentraciones de los compuestos. El efecto de las drogas sobre el cultivo fue comparado con un control (medio Schneider más el inóculo de células) y un control DMSO (Medio Schneider con el inóculo de células y las diferentes concentraciones de DMSO utilizadas en nuestros ensayos) el cual es el vehículo donde se disuelven la drogas, para confirmar que el efecto observado es producto de los compuestos y no del disolvente empleado. El crecimiento celular se estimó por medidas espectrofotométricas a 560nm cada 24h durante cinco días.

Los resultados fueron graficados utilizando el programa Sigmaplot 12.0 y para el cálculo del IC_{50} se utilizó la función "Four Parameter Logistic Curve".

3.4. Efecto de FR25 y FR95 sobre la morfología de promastigotes de *L. mexicana*

Los promastigotes de *L. mexicana* tratados con los compuestos FR25 (9µM y 15µM) y FR95 (16µM y 20 µM), así como sus respectivos controles se recolectaron por centrifugación (5.000g por 2 minutos) y se lavaron 3 veces con Tampón Fosfato Salino (PBS) 150mM (NaCl 0,12M, NaHPO₄ 10x10⁻³ M, KH₂PO₄ 3,16x10⁻³ M) pH 7,2. Seguidamente, se colocó una gota de la suspensión de parásitos en un portaobjeto y se procedió a la visualización de los promastigotes en un microscopio de luz NIKON bajo el objetivo de inmersión (100X).

3.5. Ensayo de citotoxicidad de FR25 y FR95 sobre macrófagos murinos de la línea celular J774.

La toxicidad de los diferentes compuestos sobre los macrófagos, se evaluó mediante el método cuantitativo del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) (Mosmann, 1983).

Los macrófagos (5000 células/pozo) se sembraron en placas de 96 pozos estériles, en medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, 1% Penicilina/Estreptomicina y 2mM L-glutamina y se incubó por 24h. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a someter a las células a diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar durante 48 horas. Posteriormente, se descartó el medio y se añadió MTT a una concentración final de 0,2 mg/ml. En esta condición se incubó durante 3 horas a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación se descartó el medio y se añadió 50µL de DMSO puro. Luego de 15 minutos se procedió a realizar la determinación de la intensidad del color, a 540nm, en un lector ELISA (TECAN-Spectralfluor). La intensidad de color es proporcional a la cantidad de células viables o células metabólicamente activas.

Posteriormente se estimó el porcentaje de inhibición de la proliferación de la droga sobre los macrófagos con respecto al control (células incubadas sin droga).

3.6. Infección de macrófagos múridos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. mexicana*

Los macrófagos múridos de la línea celular J774 cultivados hasta confluencia, fueron resuspendidos y sembrados sobre laminillas estériles colocadas en cámaras de 6 pozos (150.000 macrófagos por laminilla), en 2ml de medio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado con 10 % de SFB y 1% de Penicilina/Estreptomicina. Al cabo de 24h (a 37°C en atmosfera 5% CO₂), se añadieron los promastigotes de *L. mexicana* en fase estacionaria, en una relación de diez promastigotes por cada macrófago y se incubaron durante 1h a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados rápidos con medio RPMI 1640 con la finalidad de eliminar los parásitos no internalizados, y se mantuvo el cultivo en las mismas condiciones.

3.7. Efecto de los compuestos quinolónicos FR25 y FR95 sobre el porcentaje de infección de macrófagos múridos por amastigotes de *L. mexicana*

Los macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana* (sección 3.6) fueron tratados con diferentes concentraciones de los compuestos FR25 y FR95. Transcurridas las 48 horas de incubación, el medio fue removido de los pozos y los macrófagos se lavaron dos veces con PBS 150mM pH 7,2. Posteriormente se fijaron con metanol absoluto por 15 minutos y se tiñeron con Giemsa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) diluido 1/10 durante 20 minutos, transcurrido el tiempo se retiró el exceso de colorante con agua destilada.

Se realizó el conteo del número de macrófagos infectados y no infectados para determinar el porcentaje de infección al igual que los amastigotes intracelulares presentes en 100 macrófagos en los cultivos tratados y no tratados utilizando el objetivo de inmersión (100X) de un microscopio óptico.

3.8. Efecto de FR25 y FR95 en combinación con la miltefosina sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*

Para evaluar el efecto de la combinación de las drogas sobre promastigotes de *L. mexicana*, se siguió el protocolo descrito en la sección 3.3. Las concentraciones ensayadas para la combinación de miltefosina y de los compuestos quinolónicos FR25 y FR95 se encuentran en la Tabla 3. Dichas combinaciones se realizaron a concentraciones por debajo de los valores del MIC (concentración mínima inhibitoria del 90% de la proliferación celular) según el método de Hallander y col. (1982).

Tabla 3. Combinación de los compuestos FR25 y FR95 con la miltefosina sobre promastigotes de *L. mexicana*.

MTF + FR25
8 μ M + 2 μ M
4 μ M + 8 μ M
1 μ M + 15 μ M
MTF + FR95
8 μ M + 2 μ M
3 μ M + 8 μ M
1 μ M + 15 μ M

Los valores del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) se obtuvieron según la fórmula descrita por Hallander y col., (1982) (figura 3) con el propósito de definir el tipo de interacción (antagonista, sinérgica o aditivo) de cada combinación. La construcción de los isobogramas, representación gráfica de la combinación donde cada

eje representa las concentraciones de las drogas en escala lineal, se realizó utilizando el programa Sigmaplot 12.0.

$$\sum FIC = \frac{\text{MIC A en combinación}}{\text{MIC A sin combinar}} + \frac{\text{MIC B en combinación}}{\text{MIC B sin combinar}}$$

Figura 3. Fórmula descrita por Hallander y col. (1982) para el cálculo de los valores del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC).

Si el valor de FIC resulta ser mayor a 1, la combinación de los fármacos se clasifica como antagonista, si es igual a 1 como aditiva, si es menor a 1 como sinergismo moderado y si es menor a 0,5 como un sinergismo fuerte. Por otro lado, al representar gráficamente el isoblograma, si la combinación resulta ser aditiva, la isobola es una recta mientras que, si la combinación resulta ser sinérgica o antagonista, las isobolas serán cóncava o convexa, respectivamente.

3.9. Efecto de FR25 y FR95 en combinación con la miltefosina sobre amastigotes intracelulares de *L. mexicana*

Para evaluar el efecto de la combinación de las drogas sobre amastigotes de *L. mexicana*, se siguió el protocolo descrito en la sección 3.7. Las combinaciones realizadas a concentraciones por debajo de los valores del MIC se encuentran en la tabla 4.

Tabla 4. Combinación de los compuestos FR25 y FR95 con la miltefosina sobre amastigotes intracelulares de *L. mexicana*.

MTF + FR25
0,5 µM + 3,5 µM
2 µM + 1 µM
1 µM + 2 µM
MTF + FR95
0,5 µM + 3 µM
2 µM + 1 µM
1 µM + 2 µM

4. RESULTADOS

4.1. Efecto de los compuestos quinolónicos sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*

La actividad antiproliferativa de varios compuestos quinolónicos fue evaluada *in vitro* contra promastigotes de *L. mexicana* (MHOM/BZ/82/Bel-21). El tratamiento con las diferentes drogas a 50µM resultó en una inhibición de la proliferación celular del parásito (Tabla 5). De todos los compuestos ensayados, el FR25 y el FR95 fueron lo más efectivos, al inhibir la proliferación del promastigote en un 98% y 96,3% respectivamente, en comparación con las otras drogas utilizadas, por lo cual se seleccionaron para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de los compuestos quinolónicos sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*.

COMPUESTO (50µM)	%DE INHIBICIÓN (48 horas)
FR2	42,8
FR24	49
FR25	98
FR94	84,4
FR95	96,3
FR96	84,4

Los datos mostrados son el resultado de dos experimentos independientes.

4.2. Efecto de los compuestos FR25 y FR95 sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*

La actividad antiproliferativa de los compuestos FR25 y FR95 contra promastigotes de *L. mexicana* fue ensayada *in vitro*. Los parásitos fueron incubados con diferentes concentraciones de las drogas, observándose una inhibición dosis-dependiente de la proliferación celular. El IC₅₀ determinado a las 48 horas de tratamiento con FR25 fue de 8,93µM (figura 4-A). A concentraciones superiores a 20µM se alcanzó un 90% de inhibición de la proliferación del parásito, siendo 25µM la concentración mínima inhibitoria

del 90% de la población celular (MIC). Por otra parte FR95 mostró un IC_{50} de $16,12\mu M$ (figura 4-B) y un MIC de $30\mu M$. Es importante resaltar que el DMSO a una concentración del 1% no ejerció efecto significativo en la proliferación celular del parásito.

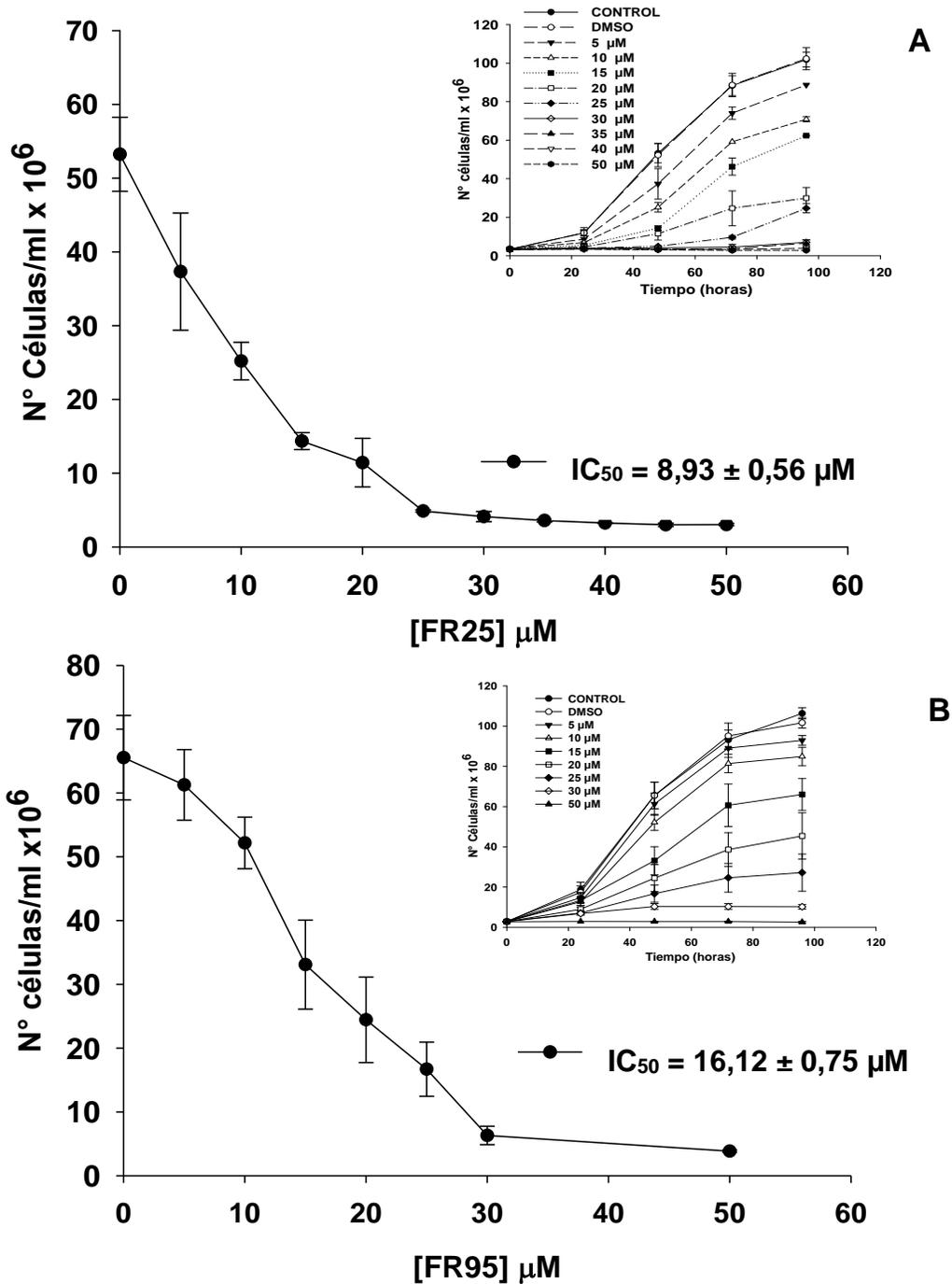


Figura 4. Efecto del compuesto (A) FR25 y (B) FR95 sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* a las 48h. Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes.

4.3. Efecto de los compuestos FR25 y FR95 sobre la morfología de promastigotes de *L. mexicana*

Las células fueron incubadas con los compuestos FR25 a 9 μ M y 15 μ M y FR95 a 16 μ M y 20 μ M, durante 48 horas. La figura 5-A corresponde al ensayo control sin tratamiento, en donde se observa la morfología típica de los promastigotes, con una forma fusiforme y flagelar. De igual forma, las células tratadas con DMSO al 1% (figura 5-B), no muestra diferencias morfológicas con respecto al control realizado.

Sin embargo en los promastigotes de *L. mexicana* tratados con FR25 (figuras 5 C-E) y FR95 (figuras 5 D-F) se observaron modificaciones de la forma alargada típica de las células, siendo frecuente la presencia de parásitos redondeados y multiflagelados.

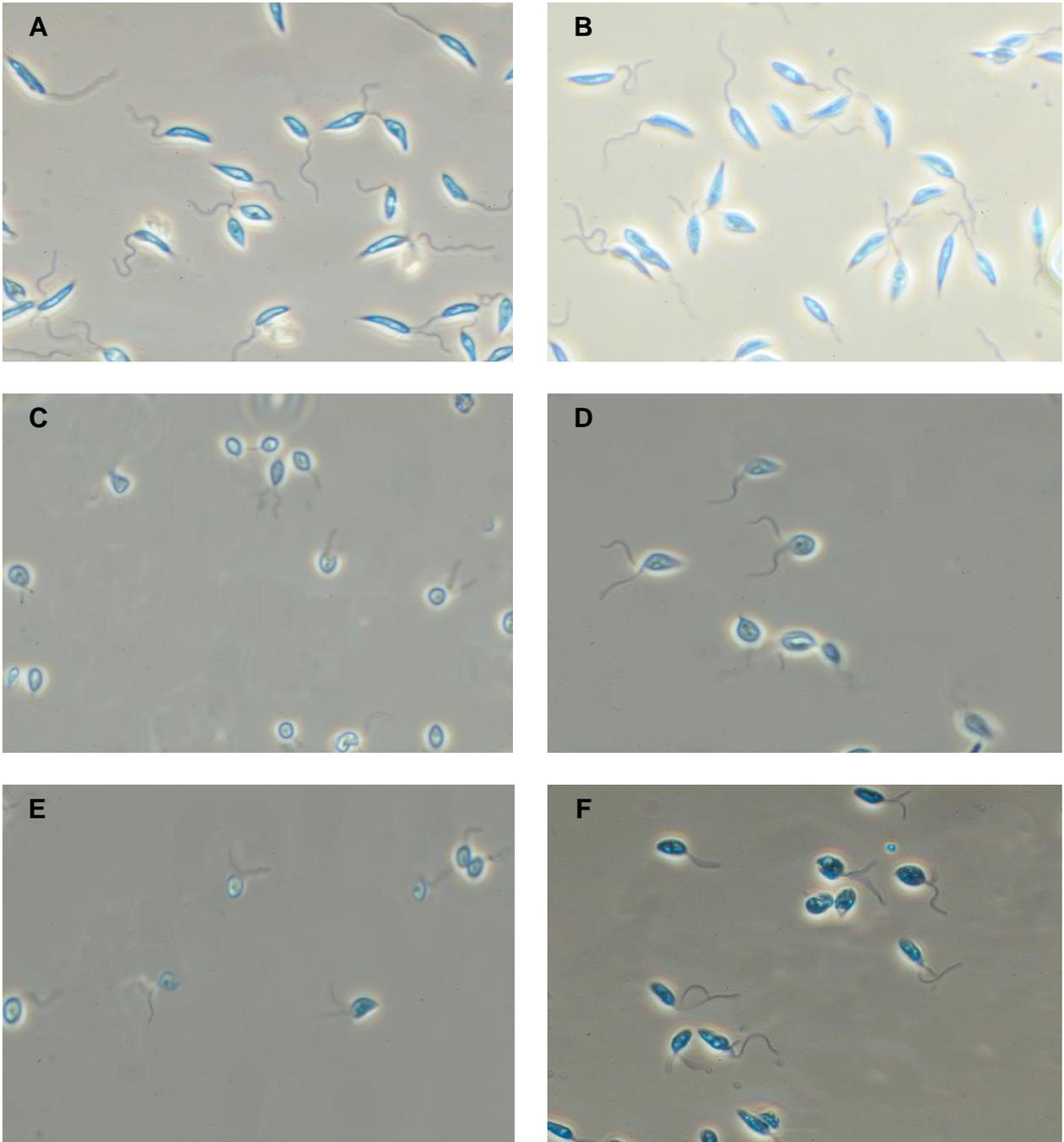


Figura 5. Efecto de FR25 y FR95 sobre la morfología de promastigotes de *L. mexicana*. (A) Control; (B) DMSO; (C) FR25 9µM; (E) FR25 15µM; (D) FR95 16µM (F) FR95 20µM (40X)

4.4. Citotoxicidad de FR25 y FR95 sobre los macrófagos múridos de la línea celular J774.

Se evaluó la actividad citotóxica de cada compuesto sobre macrófagos múridos de la línea celular J774 mediante el ensayo con MTT. El valor del IC_{50} obtenido fue de $28\mu M$ para FR25 (figura 6) y de $34,2\mu M$ para FR95 (figura 7) a las 48 horas de incubación, ambos superiores a los valores de IC_{50} obtenidos para los promastigotes de *L. mexicana*. Por lo tanto, estos compuestos no mostraron un efecto significativo sobre los macrófagos en el rango de concentraciones utilizadas en este trabajo de investigación.

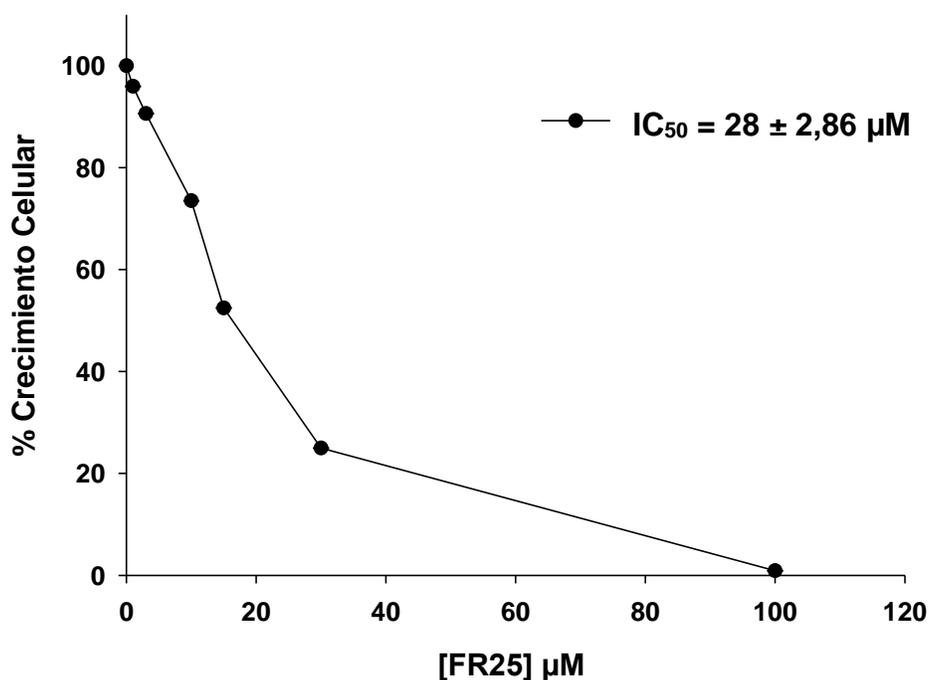


Figura 6. Efecto citotóxico del compuesto FR25 sobre macrófagos múridos de la línea celular J774. Los datos mostrados son el resultado de ocho experimentos independientes

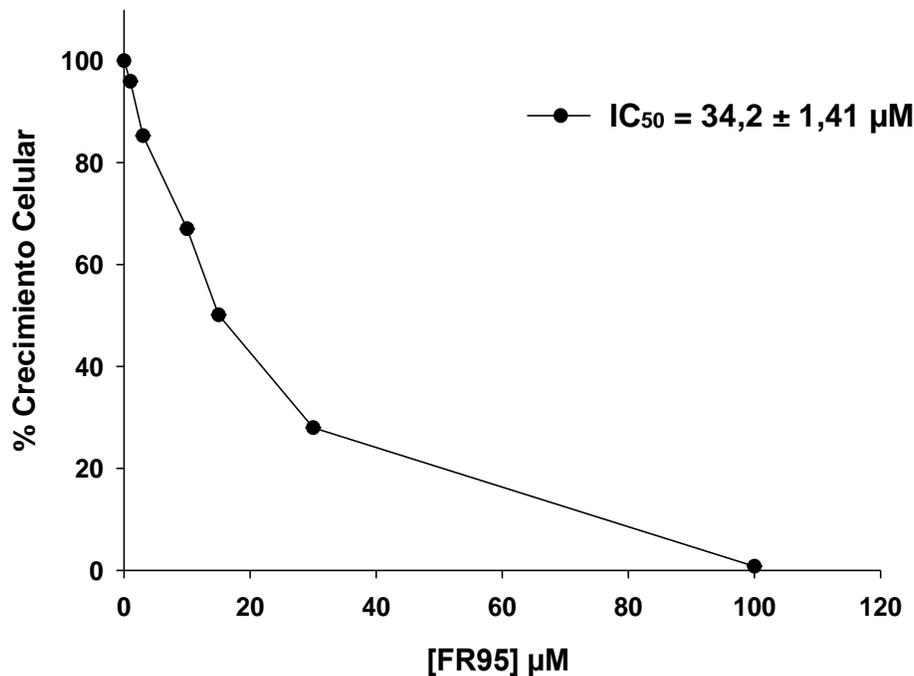


Figura 7. Efecto citotóxico del compuesto FR95 sobre macrófagos murchos de la línea celular J774. Los datos mostrados son el resultado de ocho experimentos independientes

4.5. Efecto de FR25 y FR95 sobre el porcentaje de infección de macrófagos murchos por amastigotes de *L. mexicana*

Se estudió el efecto de FR25 y FR95 sobre amastigotes de *Leishmania mexicana* en macrófagos murchos de la línea celular J774. Ambos compuestos fueron capaces de disminuir el número de macrófagos infectados (porcentaje de infección) con respecto al control a medida que aumenta la concentración de los compuestos (Tabla 6, figura 8, y figura 9). Adicionalmente, se observó en presencia de las drogas una reducción en el número de amastigotes por célula (tabla 6 y figura 9). El tratamiento con altas concentraciones de la droga produjo número significativo de vacuolas sin parásitos dentro de los macrófagos tratados (figura 9).

Tabla 6. Efecto de los compuestos FR25 y FR95 sobre el porcentaje de infección de macrófagos de la línea celular J774 con amastigotes de *L. mexicana*.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (μM)	% DE INFECCIÓN	N° AMASTIGOTES/CÉL.
CONTROL	-	69 \pm 4	6 \pm 2
FR25	1	30 \pm 2	2 \pm 1
	3	17 \pm 6	2 \pm 1
	6	14 \pm 6	1 \pm 0,5
	10	10 \pm 2	1 \pm 0,25
	15	6 \pm 1	1 \pm 0,5
FR95	1	25 \pm 4	2 \pm 1
	3	15 \pm 1	2 \pm 1
	6	12 \pm 2	1 \pm 0,5
	10	8 \pm 1	1 \pm 0,25
	15	6 \pm 1	1 \pm 0,5

Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes.

Los valores de IC_{50} determinados a las 48 horas fueron de 2,19 μM para FR25 (figura 8- A) y de 1,15 μM para FR95 (figura 8-B). Se observó a una concentración de 1 μM una inhibición del porcentaje macrófagos infectados del 57% con FR25 y del 60% con FR95 respectivamente, asimismo a 10 μM , para ambas drogas, se observó una disminución del porcentaje de infección del 90%. Este valor (10 μM) fue establecido como el MIC para cada uno de los compuestos.

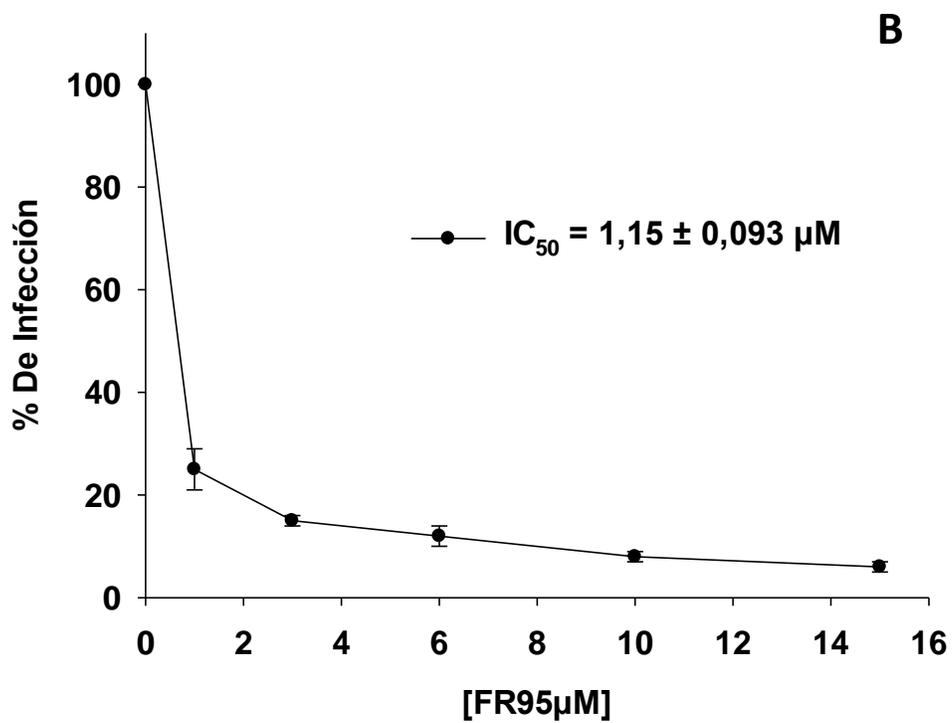
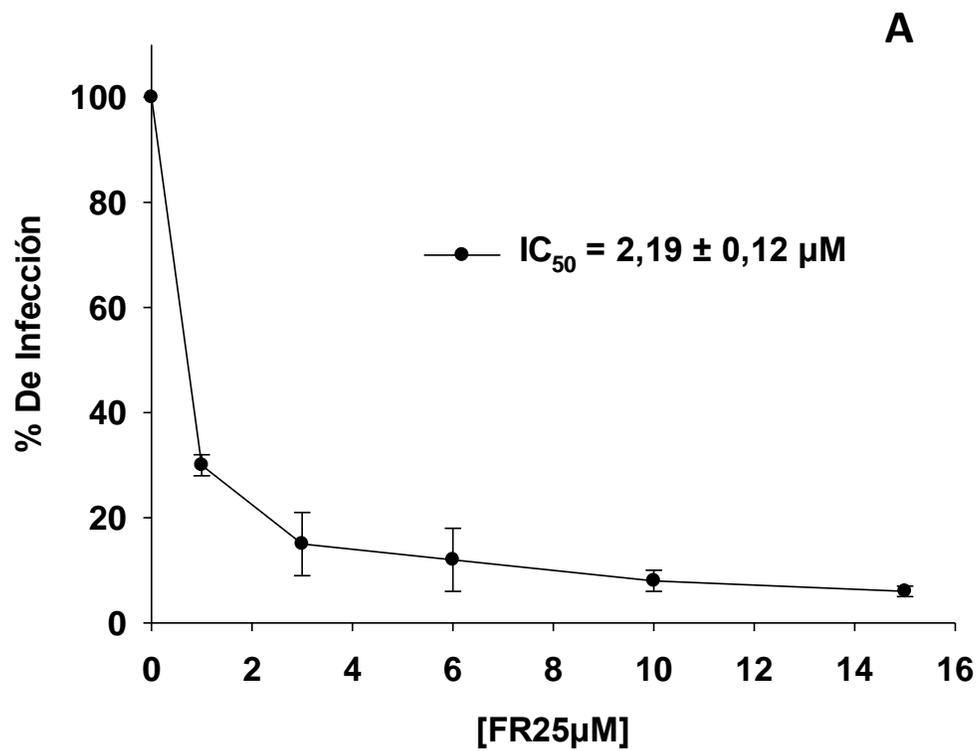


Figura 8. Efecto de los compuestos FR25 (A) y FR95 (B) sobre el porcentaje de infección de macrófagos múridos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. mexicana*.

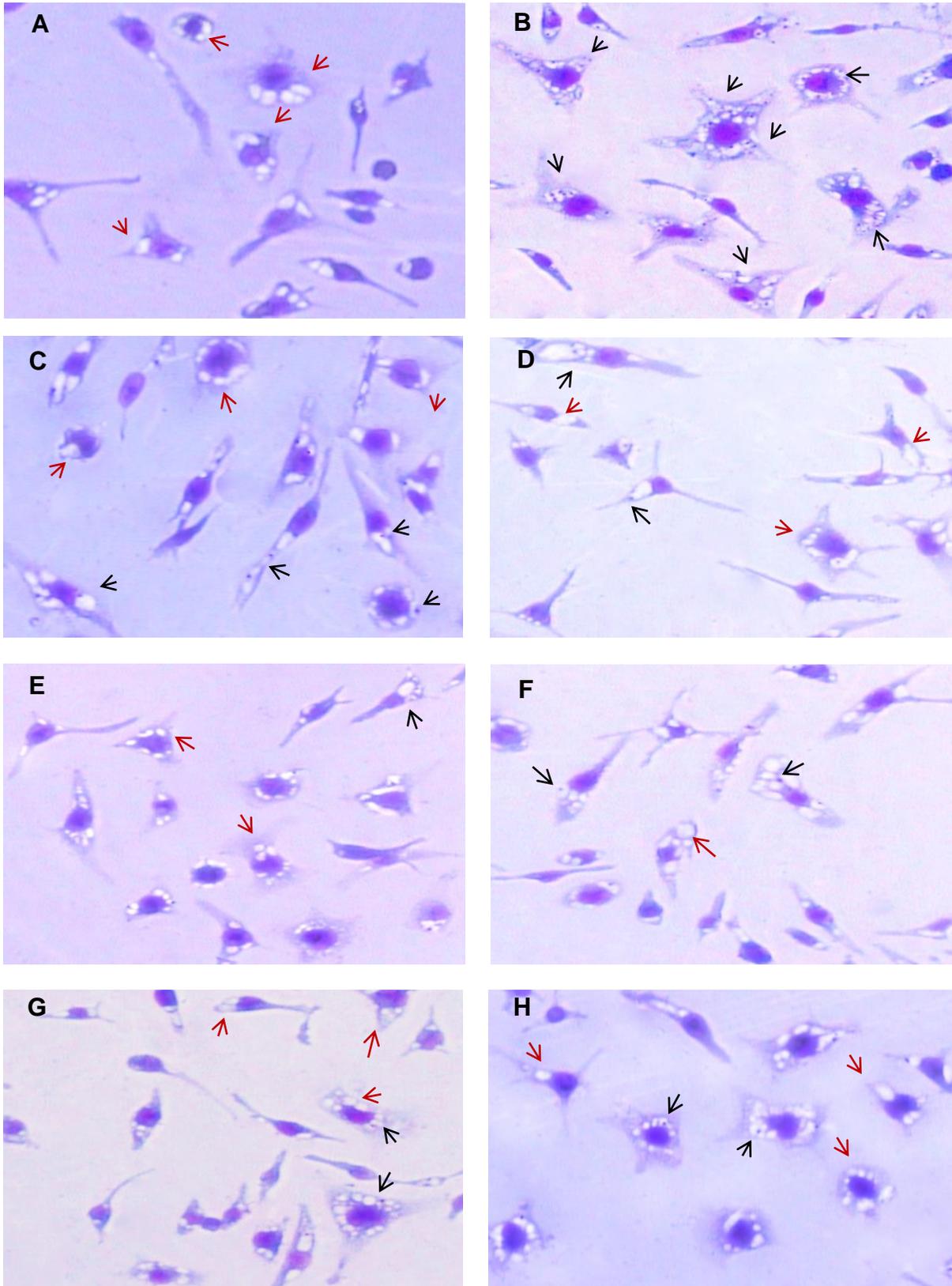


Figura 9. Efecto de FR25 y FR95 sobre el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes de *L. mexicana*. (A) Control sin infectar; (B) Control infectado; (C) 1 μM FR25; (E) 6 μM FR25; (G) 10 μM FR25; (D) 1 μM FR95; (F) 6 μM FR95; (H) 10 μM FR95. Las flechas negras indican presencia de amastigotes y las flechas rojas indican vacuolas vacías. (100X)

4.6. Efecto de FR25 y FR95 en combinación con la miltefosina sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*

Se evaluó el efecto de los compuestos quinolónicos FR25 y FR95 en combinación con la miltefosina sobre los promastigotes de *L. mexicana*. Al construir el isoblograma, se observó una isóbola cóncava, característica de una interacción sinérgica entre las drogas. El valor FIC de las combinaciones de MTF:FR25 fue de 0,61 (figura 10), menor a 1 lo que clasifica la interacción entre ambas drogas como un sinérgismo moderado.

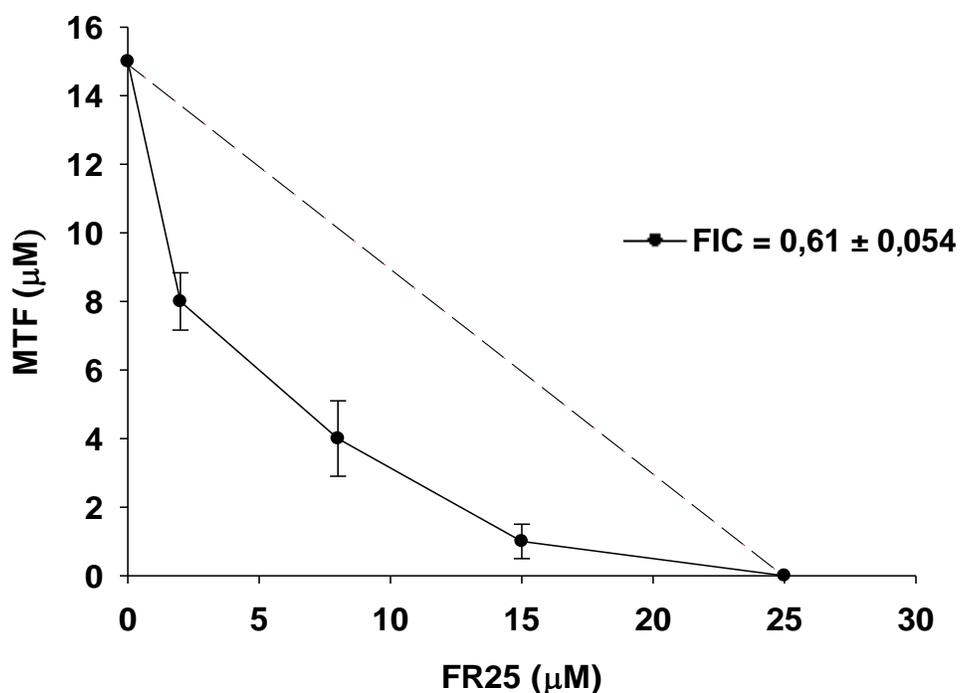


Figura 10. Isoblograma de la combinación de MTF:FR25 sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación de MTF:FR25. Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes.

De igual forma, al construir el isoblograma para la combinación entre MTF:FR95 se observó una isóbola cóncava (figura 11), un poco más pronunciada que la anterior (figura 10) lo que indica que esta combinación fue más eficaz que la de MTF:FR25, con un valor de FIC de 0,56.

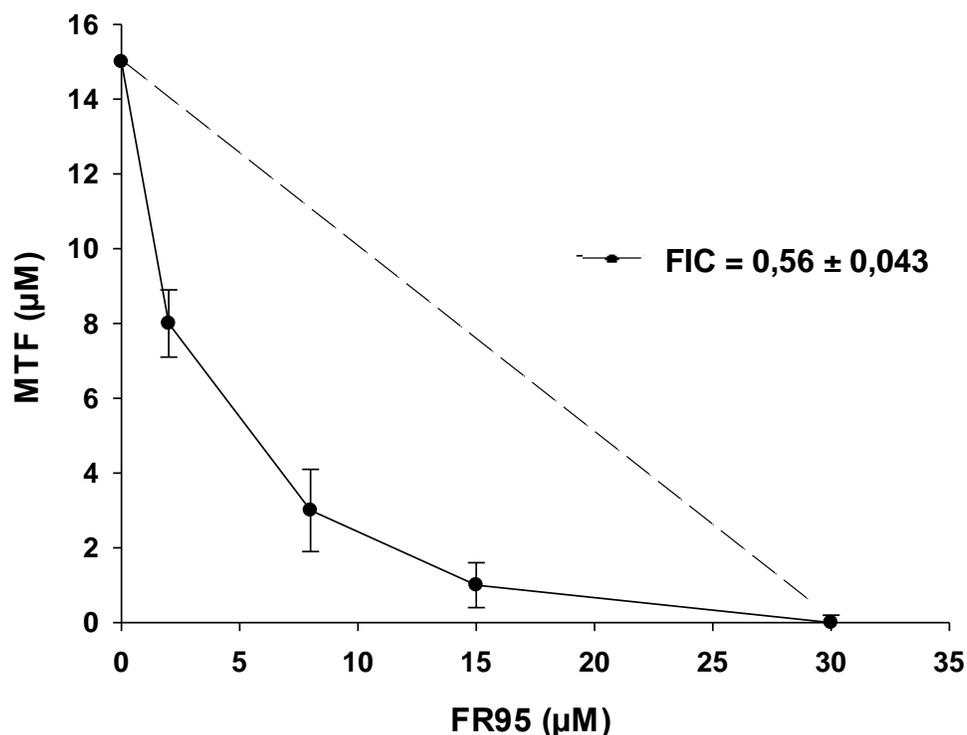


Figura 11. Isoblograma de la combinación de MTF:FR95 sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación de MTF:FR95. Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes.

4.7. Efecto de FR25 y FR95 en combinación con la miltefosina sobre el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes intracelulares de *L. mexicana*

El efecto de combinar las quinolinas con el fármaco miltefosina también fue ensayado sobre amastigotes de *L. mexicana* en macrófagos murinos de la línea J774.

La figura 12-A muestra macrófagos no infectados, en donde se diferencia el núcleo y citoplasma de la célula, sin presencia de parásitos. En contraste, en el control de infección (figura 12-B), se observaron de 4 a 5 amastigotes de *L. mexicana* dentro de las vacuolas lisosomales del macrófago. En las células tratadas con las diferentes combinaciones de los compuestos se observó una disminución significativa del porcentaje

de infección así como una reducción de la cantidad de amastigotes presentes por células (figura 12 C-H).

Al construir los isobogramas para ambas combinaciones se obtiene una isóbola cóncava, lo que indica un claro sinergismo. El FIC determinado para la combinación de MTF:FR25 (figura 13-A) fue de 0,36 y MTF:FR95 (figura 13-B) fue de 0,35 ambas menores a 0,5 lo que muestra un fuerte sinergismo. Cabe destacar que el morfotipo amastigotes fue más susceptible al tratamiento con las combinaciones, lo que se refleja en los valores de FIC determinados.

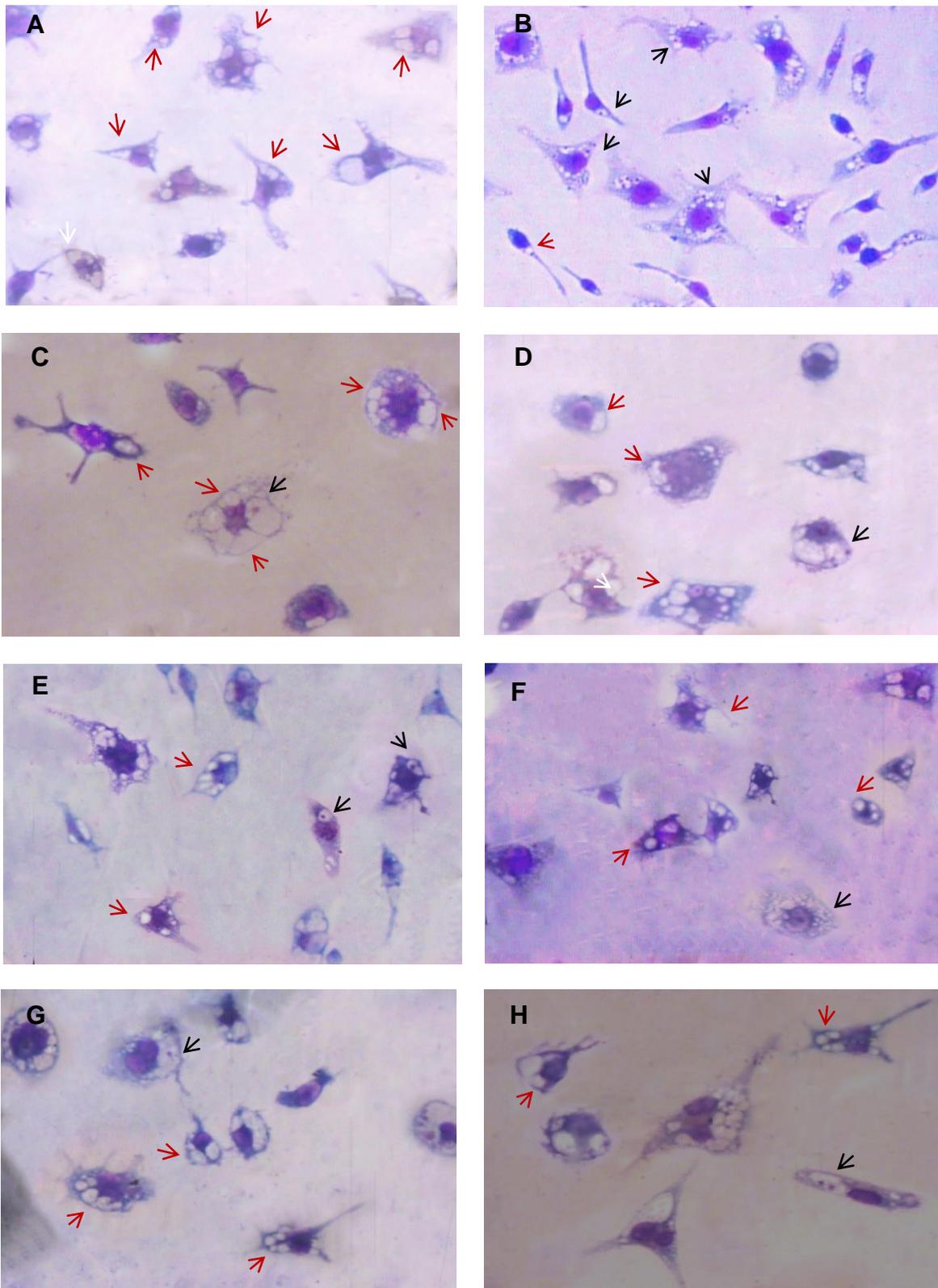


Figura 12. Efecto de FR25 y FR95 en combinación con la miltefosina sobre amastigotes intracelulares de *L. mexicana*. (A) Control sin infectar; (B) Control infectado; (C) 0,5 μ M MTF + 3 μ M FR25; (E) 2 μ M MTF + 1 μ M FR25; (G) 1 μ M MTF + 2 μ M FR25; (D) 0,5 μ M MTF + 3 μ M FR95; (F) 2 μ M MTF + 1 μ M FR95; (H) 1 μ M MTF + 2 μ M FR95. Las flechas negras indican presencia de amastigotes y las flechas rojas indican vacuolas vacías. (100X).

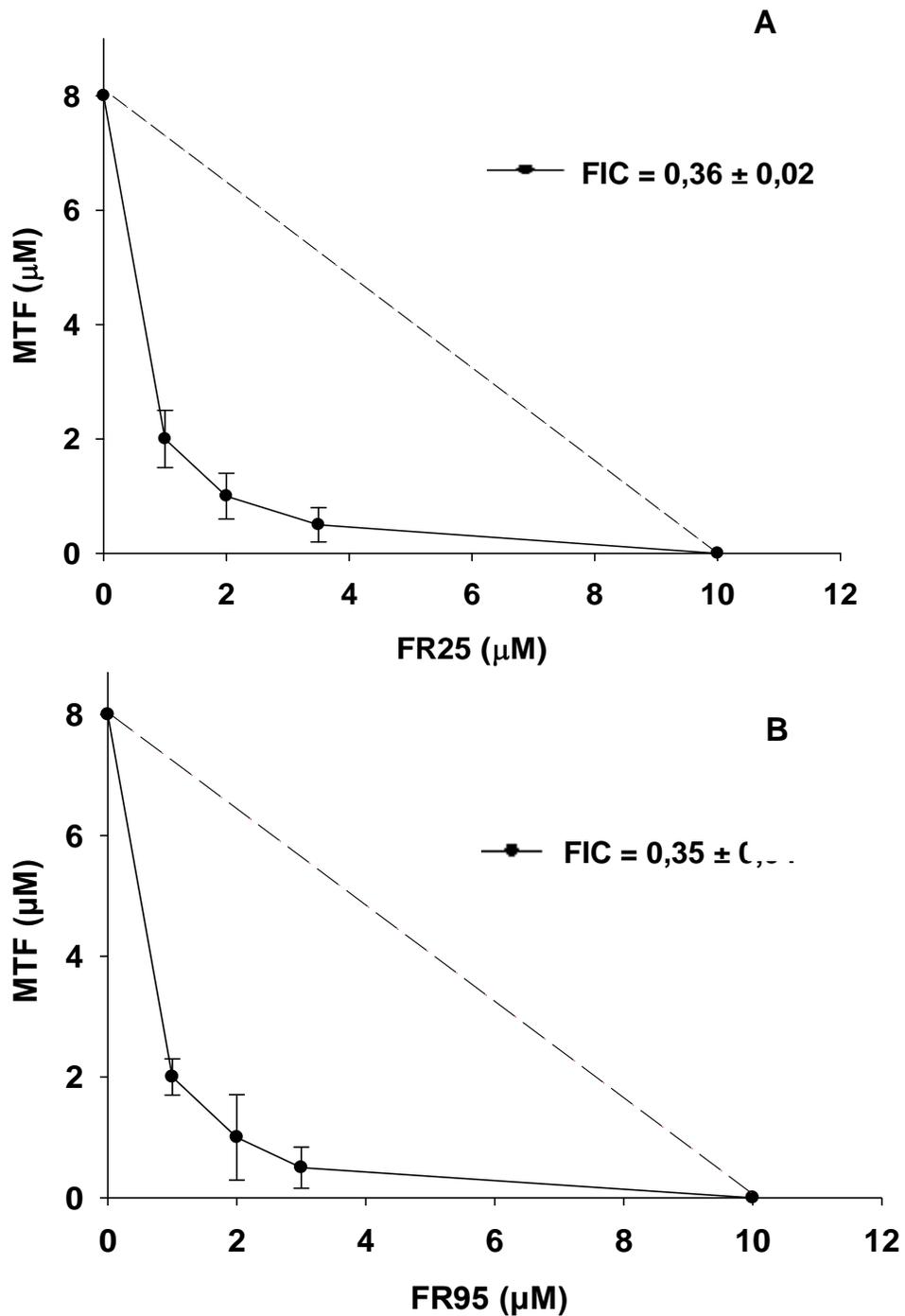


Figura 13. Isoblograma de la combinación de MTF:FR25 (A) y MTF:FR95 (B) sobre el porcentaje de infección de macrófagos murinos por amastigotes intracelulares de *L. mexicana*. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación. Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes.

5. DISCUSIÓN

En épocas en que el hombre solo tenía a su disposición los recursos que la naturaleza le otorgaba, buscó en estos las herramientas necesarias para mitigar los síntomas producidos por diversas enfermedades (Bodeker y Kronenberg, 2002). En este sentido, nuestros antepasados exploraron a través de ensayos prácticos, aquellos recursos que de alguna manera les resultaron provechosos por sus propiedades nutritivas, terapéuticas y toxicológicas. Entre los más utilizados por las distintas culturas, se encuentran los recursos minerales, animales y vegetales (Belemie y col., 2004). En este punto de la historia, el hombre comienza a ser consciente del gran potencial terapéutico que proporcionaban diferentes especies de plantas para el tratamiento de diversas patologías (González-Insuasti y col., 2008).

Las plantas poseen un complejo metabolismo, que puede desempeñar un papel predominante en el desarrollo y en la investigación experimental como punto de partida para la producción de nuevos fármacos. Sin embargo, a pesar de la variedad de especies existentes a nivel mundial, solo se conoce un tercio de la composición y variabilidad química de los metabolitos secundarios que estas producen (Muiño, 2011). En la actualidad, se reporta que hay entre 35.000 y 70.000 especies de plantas que han sido utilizadas con fines medicinales en todo el mundo (Lulekal y col., 2008). Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud (Bailemie y col., 2004).

Es así como el uso de compuestos bioactivos provenientes de las plantas, ha tenido un crecimiento acelerado, debido a las diferentes propiedades biológicas que han sido demostradas contra diferentes enfermedades tropicales causadas por protozoos y otros

parásitos. Por lo tanto estos se ubican en un destacado lugar, como una de las futuras alternativas para la síntesis de nuevas drogas, más selectivas y eficaces contra estos patógenos (Teklehaymanot y Giday, 2007).

En este sentido, las regiones tropicales son fuente de una gran variedad de especies vegetales, que proveen de una innumerable cantidad de metabolitos secundarios que pueden ser utilizados en el tratamiento de numerosas enfermedades parasitarias, incluyendo la leishmaniasis (Cheikhoussef y col., 2011).

Los flavonoides, los terpenos, las quinonas y los alcaloides han sido reportados como los derivados de plantas con mayor actividad frente a diferentes especies de *Leishmania*. Dentro del grupo de los alcaloides, se destacan los compuestos heterocíclicos quinolínicos, ya que han sido ampliamente utilizados como fármacos antiprotozoarios, demostrando tener una alta eficacia contra estas enfermedades (Polonio y Efferth, 2008; Richard y Werbovetz, 2010).

Los primeros derivados quinolínicos utilizados como fármacos, fueron la cloroquina y la primaquina, unas aminoquinolinas, que además de utilizarse en la actualidad como antimaláricos, también han demostrado ser activas contra diferentes especies de *Trypanosoma* y *Leishmania* (Tekwai y Walker, 2006). De los estudios mencionados anteriormente, surgió un considerable interés en el desarrollo de análogos de quinolinas con mayor eficacia frente otros patógenos protozoarios, como *Leishmania sp.* En este contexto, se han llevado a cabo ensayos clínicos con diversos derivados de las 8-aminoquinolinas, como la sitamaquina y la tafenoquina, con los que se han obtenido porcentajes de recuperación superiores al 80% (Carvalho y col., 2011). Estos resultados abren posibilidades al desarrollo de nuevas drogas con actividad leishmanicida, que sustituyan a los fármacos utilizados en la quimioterapia actual, ya que estos están

asociados a severos efectos secundarios, así como el desarrollo de resistencia (Yeates, 2002; Wasunna, 2005).

Atraídos por los prometedores efectos leishmanicidas de varios compuestos quinolínicos, en este trabajo decidimos evaluar el efecto antiproliferativo de compuestos, de la serie 7-cloroquinolina -4-oxifenil sustituida, sobre *Leishmania mexicana*. Los resultados obtenidos muestran una marcada inhibición de la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* en presencia de todos los compuestos ensayados. Las quinolinas FR25 o 7-cloroquinolina -4-oxifenil (2-metoxi-5-carboxialdehído) de fórmula empírica $C_{17}H_{12}ClNO_3$ y FR95, 7-cloroquinolina -4-oxifenil (2-metoxi-5-tiocarbamida) ($C_{18}H_{15}ClN_4O_2S$), resultaron ser más activas que el compuesto cabeza de serie FR2 ($C_{16}H_{10}ClNO_2$). Este aumento en la actividad inhibitoria de la proliferación del parásito con ambos compuestos, se puede asociar a la adición, en la posición C2 de la estructura madre, de un grupo metoxi ($-O-CH_3$). Por otra parte, la sustitución en la estructura de FR95 del grupo aldehído (posición C5) por un grupo tiocarbamida produce una disminución en la efectividad del compuesto con respecto a FR25, lo cual se refleja en los valores de los IC_{50} reportados.

El posible efecto inhibitorio de esta familia de compuestos también fue evaluado sobre macrófagos murinos de la línea celular J774, demostrando que estas quinolinas no tienen un efecto significativo sobre la viabilidad de los macrófagos a las concentraciones ensayadas, encontrando valores de IC_{50} de $28\mu M$ para FR25 y de $34,2\mu M$ para FR95. De igual forma estas quinolinas no tienen un efecto significativo sobre fibroblastos humanos, reportándose valores de IC_{50} de $61,3\mu M$ para FR25 mientras que FR95 no tuvo ninguna actividad.

Adicionalmente, el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores (IBE-UCV) evaluó el efecto citotóxico de FR25 y FR95 sobre diferentes líneas tumorales. Este grupo

de investigación encontró que la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) fue la menos sensible a estas drogas, estimando valores de IC_{50} de $55\mu M$ con FR25 y de $52,2\mu M$ para FR95 mientras que en líneas celulares de cáncer de próstata (PC3) y cuello uterino (HeLa) encontraron valores de IC_{50} de $21,3\mu M$ y $18\mu M$ y de $17,6\mu M$ y $11,6\mu M$ para FR25 y FR95, respectivamente.

Los resultados descritos en las líneas celulares de cáncer próstata y cuello uterino son comparables con los obtenidos en nuestros ensayos, donde se reportaron valores de IC_{50} de $8,97\mu M$ para FR25 y de $16,17\mu M$ para FR95 sobre promastigotes de *L. mexicana*, logrando evidenciar el potencial que tienen esta familia de compuestos sobre diferentes patologías.

Sharma y col. (2014) evaluaron una serie de drogas, con el mismo núcleo quinolínico de nuestros compuestos, la 7-cloroquinolina. Estos autores reportaron una inhibición dosis-dependiente con todos los productos ensayados, con rangos de IC_{50} entre $1-18\mu M$ en promastigotes de *L. donovani*, similares a los obtenidos en nuestro trabajo, lo que evidencia que esta numerosa familia de derivados quinolínicos es una fuente potencial de compuestos para el desarrollo de futuras drogas anti-*Leishmania*.

Estudios con otros análogos quinolínicos, como las tetrahydroquinolinas (Kouznetsov y col., 2007), indeno-quinolinas (Mitzuani y col., 2002), esteril-quinolinas (Tempone y col., 2005) y las fenil-quinolinas (Bompart y col., 2013), también han mostrado una fuerte acción antiproliferativa en promastigotes de distintas especies de *Leishmania*.

Con la finalidad de profundizar en el efecto de estos compuestos sobre los promastigotes de *L. mexicana*, se evaluaron los cambios morfológicos de estos en presencia de las quinolinas FR25 y FR95. Las células incubadas con FR25 (9 y $15\mu M$) y con FR95 (16 y $20\mu M$) mostraron alteraciones asociadas a la morfología del parásito, desde una forma alargada y flagelada, característica del promastigote, hasta una forma

esférica u ovoide. Por otra parte, también se observaron modificaciones a nivel del flagelo, encontrando que la mayoría de las células presentaban más de un flagelo, lo que podría sugerir que estos cambios registrados pudieran interferir en el proceso de división celular.

Alteraciones en la morfología de estos parásitos también han sido observadas con otros grupos de quinolinas tales como las indenoquinolinas (Wheeler y col., 2011) y las 8-aminoquinolinas (Yeates, 2002). Estos compuestos inducen cambios significativos en la forma del parásito, así como células binucleadas y multiflageladas. Dado a que la división en estos organismos ocurre de manera secuencial, dividiéndose primero el cuerpo basal, seguido del flagelo, el kinetoplasto, el núcleo y por último el proceso de citocinesis (Wheeler y col., 2011), estos autores sugieren que los cambios registrados pudieran estar asociados a una interrupción en el proceso de división celular, específicamente en el proceso de citocinesis, debido a la presencia de células con múltiples núcleos y con más de un flagelo sin que ocurra la separación celular.

Una vez establecido el efecto inhibitorio de FR25 y FR95 sobre la proliferación de los promastigotes, se estudió la acción de los mismos sobre amastigotes intracelulares, encontrando que ambos compuestos tuvieron un efecto inhibitorio sobre el porcentaje de infección de macrófagos murinos por el parásito y una reducción del número de amastigotes de *L. mexicana* presentes en las vacuolas parasitóforas del macrófago. Es importante resaltar que los amastigotes fueron mucho más sensibles que los promastigotes. Así, se observó que la concentración necesaria de los compuestos FR25 y FR95 para inhibir el 50% del porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes fue de 2,19 μ M y 1,15 μ M respectivamente, en comparación con aquella necesaria para la inhibición de la proliferación celular de los promastigotes, con valores de IC₅₀ de 8,93 μ M para FR25 y 16,12 μ M para FR95.

Esta mayor susceptibilidad del estadio amastigote con respecto a la forma promastigote, también ha sido observada en algunos fármacos utilizados en la quimioterapia actual contra la leishmaniasis. Serrano y col. (2009b) reportan para el fármaco comercial miltefosina una menor sensibilidad por parte del promastigote (IC_{50} de $8\mu M$) con respecto al amastigote (IC_{50} de $1\mu M$). Esta tendencia se ha observado con otros agentes terapéuticos utilizados como el estibogluconato de sodio y la anfotericina B (Vermeersch y col., 2009).

Asimismo, diferentes análogos de quinolinas, como la sitamaquina (Carvalho y col., 2011), la tafenoquina (Carvalho y col., 2010), la Triazino-7-cloroquinolinas (Sharma y col., 2014), las tetrahydroquinolinas (Tempone y col., 2005) y las fenilquinolinas (Bompart y col., 2013) también han mostrado ser más efectivas en la forma amastigote. Orué y col. (2007) sugieren que tal diferencia en susceptibilidad a la droga entre los dos morfotipos se deba a modificaciones bioquímicas y fisicoquímicas que ocurren en la superficie del parásito durante el proceso de transformación, con una mayor o mejor exposición de los blancos de acción de la droga en la forma amastigote en comparación con la forma promastigote.

Un aspecto de relevancia en la eficacia de los distintos derivados quinolínicos, es su acción sobre diferentes dianas moleculares del parásito. Se ha demostrado que un gran número de quinolinas afecta la bioenergética de los mismos a través de la perturbación del potencial electroquímico mitocondrial así como la alcalinización de los acidocalcisomas organelos fundamentales, en la viabilidad celular de estos (Carvalho y col., 2010; Carvalho y col., 2011; Bompart y col., 2013). La sitamaquina y la tafenoquina se acumulan rápidamente en compartimientos ácidos, produciendo la alcalinización de los acidocalcisomas del parásito (Vercesi y col., 2000). De igual forma, ambos compuestos producen una caída en los niveles intracelulares de ATP producto de la

inhibición dosis dependiente del complejo II (succinato deshidrogenasa) por parte de la sitamaquina (López-Martin y col., 2008; Carvalho y col., 2011) y el complejo III (citocromo c reductasa) por parte de la tafenoquina en promastigotes de *L. donovani* (Carvalho y col., 2010). Estos eventos están asociados a una producción de especies reactivas de oxígeno, y a un incremento de los niveles de Ca^{+2} intracelular. Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado una rápida alcalinización de los acidocalcisomas cuando los parásitos fueron expuestos a concentraciones cercanas a los IC_{50} de los compuestos. También observamos un efecto deletéreo sobre el potencial electroquímico mitocondrial de estos parásitos en presencia de ambas drogas.

A pesar de que se han desarrollado diversos compuestos con un marcado efecto antiproliferativo sobre el parásito y con diferentes blancos de acción, hasta el momento no existe un fármaco totalmente eficaz frente a esta enfermedad. Los protocolos de tratamiento y los seguimientos clínicos se han modificado considerablemente en los últimos años, pero las drogas utilizadas son básicamente las mismas hasta el momento, conduciendo en muchos casos a un fracaso terapéutico (Sundar y col., 2011). En la última década los estudios experimentales para identificar nuevos tratamientos están dirigidos, entre otras acciones, a la búsqueda de sinergismo, en el cual la acción combinada de dos o más drogas produce un efecto total mayor que el efecto de cada droga por separado (Olliaro y Taylor, 2003).

En la búsqueda de nuevas estrategias que mejoren la quimioterapia actual contra esta parasitosis, en el presente trabajo se evaluó el posible efecto sinérgico de la combinación de dos nuevos compuestos quinolínicos con actividad antiproliferativa sobre *L. mexicana*, FR25 y FR95, con la miltefosina, una droga comercial para el tratamiento de la leishmaniasis.

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación indican que las combinaciones entre FR25:MTF y FR95:MTF son sinérgicas, ya que lograron inhibir la proliferación de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* a una concentración menor que aquellas reportadas cuando los compuestos se utilizan de manera individual. Los valores de FIC determinados en la forma promastigotes fueron de 0,61 para FR25:MTF y de 0,56 para FR95:MTF, ambos menores a 1, clasificando las combinaciones como un sinergismo moderado (Hallander y col., 1982). Asimismo, se alcanzaron porcentajes de inhibición superiores al 90% con todas las combinaciones ensayadas.

La combinación de estos compuestos mostró ser más eficaz y selectiva sobre amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, con valores de FIC de 0,36 para FR25:MTF y 0,35 para FR95:MTF, lo que evidencia nuevamente la mayor susceptibilidad del estadio amastigote frente a distintas drogas, resultando de gran importancia debido a que esta es la forma responsable del mantenimiento de la infección en el hospedador vertebrado. De igual forma, en estos ensayos se obtuvo un efecto inhibitorio sobre el porcentaje de infección de macrófagos del 90% y una marcada reducción del número de amastigotes por célula.

Seifert y col. (2011) evaluaron la combinación entre la sitamaquina con la pentamidina, la miltefosina y la anfotericina B, siendo la combinación entre sitamaquina/pentamidina la más eficaz con un valor de FIC de 0,5 en amastigotes intracelulares de *L. donovani* clasificándola como un sinergismo moderado. Cabe destacar que las combinaciones ensayadas con nuestros compuestos y la miltefosina mostraron ser más eficaces que las reportadas en estos estudios, con valores de FIC de 0,36 y 0,35 para MTF:FR25 y MTF:FR95 respectivamente, siendo consideradas como un sinergismo fuerte, lo cual valida el potencial de nuestros compuestos como una alternativa en el tratamiento contra esta parasitosis.

Asimismo, otras combinaciones de fármacos leishmanicidas también han sido evaluadas en diferentes especies de *Leishmania*. De Morais-Teixeira y col. (2014) observaron que las combinaciones entre paromomicina más miltefosina y paromomicina más anfotericina B actúan sinérgicamente, reportando valores de FIC de 0,34 y 0,46 respectivamente, en amastigotes de *L. amazonensis* y *L. braziliensis*. Trinconi y col. (2014) sugieren que el mecanismo de acción de los compuestos es un factor fundamental para clasificar una combinación como sinérgica, aditiva o antagonista. En la leishmaniasis, los fármacos utilizados pertenecen a diferentes grupos químicos con distintos blancos de acción sobre el parásito, lo que sugiere que en combinación la actividad de cada droga actúe por separado, dando como resultado neto un incremento de la acción de estos sobre el parásito, en comparación con el que reportan de forma individual.

De los resultados obtenidos en este trabajo al igual que en aquellos aquí discutidos, podemos concluir que la aplicación de este esquema terapéutico ha dado resultados prometedores al lograr potenciar el efecto de los fármacos utilizados, en comparación con su utilización de forma individual. Sugiriendo que el uso de terapias combinadas, utilizando fármacos de distinta estructura química y con diferentes blancos de acción, constituye una de las estrategias para mejorar el tratamiento de la enfermedad.

Asimismo, el efecto inhibitorio de los derivados de quinolinas, producidos de forma natural o sintética, sobre distintas especies de *Leishmania* sirve como base para el diseño de nuevas drogas que podrían representar una alternativa para mejorar la quimioterapia actual contra esta parasitosis. Como ha sido demostrado, las diferentes sustituciones dentro de la estructura de un compuesto puede incrementar el efecto citotóxico de estos sobre los parásitos. En este sentido, modificaciones en la estructura química de nuestros compuestos podrían incrementar la actividad de estos en el rango nanomolar (η M).

6. CONCLUSIONES

- Las quinolinas FR25 y FR95 presentan un efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre la proliferación en cultivos *in vitro* de promastigotes de *L. mexicana*. De igual forma, estos compuestos disminuyen significativamente el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes y reducen el número de parásitos dentro de las vacuolas lisosomales.
- Estos compuestos fueron más eficaces y selectivos sobre el estadio amastigote, morfotipo de relevancia, por lo que estas quinolinas podrían proponerse como agentes potenciales para el tratamiento de esta enfermedad. Es importante resaltar que estas quinolinas no tienen un efecto significativo sobre la viabilidad de macrófagos murinos de la línea celular J774 a las concentraciones ensayadas en este trabajo.
- Los compuestos ensayados producen cambios morfológicos en promastigotes de *L. mexicana*, donde se lograron observar células de forma irregular y con múltiples flagelos, en comparación con un control sin tratamiento.
- Las combinaciones evaluadas, MTF:FR25 y MTF:FR95, resultaron en una mayor inhibición de la proliferación de promastigotes y del porcentaje de infección de macrófagos infectados por amastigotes de *L. mexicana* en comparación con las drogas utilizadas de forma individual, sugiriendo una posible acción sinérgica de la combinación de estos compuestos. Este estudio abre la posibilidad de utilizar la terapia combinada como una de las estrategias para mejorar la quimioterapia actual contra esta parasitosis.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alrajhi, A.A., Ibrahim, E.A., Devol, E.B., Khairat, M., Faris, R.M., Maguire, J.H. 2002. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *The New England Journal of Medicine*. **346**: 891-895.
2. Andersen, E.M., Cruz-Saldarriaga, M., Llanos-Cuentas, A. 2005. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **72**: 133-137.
3. Araujo, C., Alegrio, L.V., León, L.L. 1998. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. *Phytochemistry*. **49**: 751-754.
4. Ashford, R.W. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *The International Journal for Parasitology*. **30**: 1269-1281.
5. Balaña-Fouce, R., Requera, R.M., Cubría, J.C., Ordóñez, D. 1998. The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology*, **30**: 435-443.
6. Belemie, K., Kelbessa, E., Asfaw, Z. 2004. Indigeneous medicinal plant utilization, management and threats in Fentalle Area, Eastern Shewa. Ethiopia. *Ethiopian Journal of Biological Science*. **32**: 37-58.
7. Bodeker G., Kronenberg, F. 2002. A public health agenda for traditional, complementary, and alternative medicine. *The American Journal of Public Health* **21**: 1582-1591.
8. Bompert, D., Kouznetsov, V., Núñez-Durán, J., Rodríguez, D., Meléndez Gómez, C.M., Sojo, F., Arvelo, F., Visbal, G., Álvarez, A., Serrano-Martín, X., García-Marchán, Y. 2013. Anti-leishmanial evaluation of C2-aryl quinolines: mechanistic

- insight on bioenergetics and sterol biosynthetic pathway of *Leishmania braziliensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **15**: 4426-4431.
9. Bonfante-Garrido, R., Barroeta, S. 2002. Leishmaniasis y *Leishmania* en América, con especial referencia a Venezuela. 1era Edición. Venezuela, Edo. Lara, Barquisimeto.
 10. Borst, P., Ouellette, M. 1995. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *The Annual Review of Microbiology*. **49**: 427-460.
 11. Brito, A.M., Dos Santos, D., Rodrigues, S., Brito, R., Xavier-Filho, L. 2013. Plants with anti-*Leishmania* activity: integrative review 2000-2011. *Pharmacognosy Reviews*. **7**: 34-42.
 12. Carvalho, L., Luque-Ortega, J., López-Martin, C., Castanys, S., Rivas, L. Gamarro, F. 2011. The 8-aminoquinolines analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **42**: 4204-4210.
 13. Carvalho, L., Luque-Ortega, J., Manzano, J., Castanys, S., Rivas, L., Gamarro, F. 2010. Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinolines, targets *Leishmania* respiratory complex III and induces apoptosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **42**: 5344-5351.
 14. Cheikhyoussef, A., Shapi, M., Matengu, K. M., Ashekele, H. 2011. Ethnobotanical study of indigenous knowledge on medicinal plant use by traditional healers in Oshikoto region, Namibia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. **21** :7-10.
 15. Chunge, C. N., Owate, J., Pamba, H. O., Donno, L. 1990. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **84**: 221-225.

16. Croft, S.L., Yardley, V. 2002. Chemotherapy of leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design*. **8**: 319-342.
17. De Lima H., Borges R., Escobar J., y Convit J. 2011. Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela, bienio 2008-2009. Boletín de malariología y salud ambiental Vol. LI, Nº 2. 215-24.
18. De Macedo-Silva, S.T., Urbina, J.A., de Souza, W., Rodrigues, J.C. 2013. *In vitro* activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. *Public Library of Science*. **23**: 83247-83253.
19. De Morais-Teixeira, E., Gallupo, M., K., Rodrigues, L., F., Ramanha, A. L., Rabello, A. 2014. *In vitro* interaction between paromomycin sulphate and four drugs with leishmanicidal activity against three New World *Leishmania* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **68**: 150-154.
20. Dorey, G., Lockart, B., Lestage, P., Casara, P. 2002. New quinolinic derivatives as centrally antioxidants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **10**: 935-939.
21. González-Insuasti, M., Martorell, C., Caballero, J. 2008. Factors that influence the intensity of non- agricultural management of plant resources. *Agroforestry Systems*. **15**: 119-122.
22. Hallander, H. O., Dornbusch, K., Gezelius, L., Jacobson, K., Karlsson, I. 1982. Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **22**: 743–752.
23. Herwalt, V. 1999. Leishmaniasis. *Lancet*. **354**: 1191-1199.
24. Inostroza, A., Américo, J., Eloisa, M., Hugo, E. 2011. Evaluación de la actividad leishmanicida y toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de los tallos de *Croton alnifolius*. *Ciencias e Investigación*. **14**: 15-21.

25. Jha, T. K. 2005. A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **73**: 1005–1011.
26. Kouznetsov, V.V., Vergas, L.Y., Leal, S.M., Mora, U., Coronado, C.A., Meléndez, C.M., Romero, A.R. 2007. Target-oriented synthesis of antiparasitic 2-Hetaryl Substituted Quinolines based on imino Diels-Alder Reactions. *Letters in Drug Design & Discovery*. **4**: 293-296.
27. Lévy, S., Azoulay, S. 1994. Stories about the origin of quinquina and quinidine. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* **7**: 635-636.
28. López-Martin, C., Perez-Victoria, M., Carvalho, L., Castanys, S., Gamarro, F. 2008. Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomas. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **32**: 4030- 4036.
29. Lulekal, E., Kelbessa, E., Bekele, T., Yineger, H. 2008. An ethnobotanical study of medicinal plants in Mana Angetsu District, southeastern Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. **25**: 1186-1746.
30. Mesa, A., Molano, P., Seon, B. 2008. Synthesis and in vitro leishmanicidal and cytotoxic activities of analogues 2-styrylquinolines. *Vitae*. **15**: 259-266.
31. Mitsuani, 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. *The Journal of Biological Chemistry*. **50**: 39684-30680.
32. Molyneux, D.H., Killick-Kendrick, R. 1987. Morphology, ultrastructure and life cycle. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: *Academic Press*, **42**: 121-176.

33. Monzote, L. 2009. Current treatment of leishmaniasis. *The International Journal of Antimicrobial Agents*. **1**: 9-19.
34. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: Aplication to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*. **65**: 55-63.
35. Muiño, W. 2011. Medical ethnobotany of the transitional area between Pampa and Cuyo region. *Bonplandia*. **23**: 353-369.
36. Neal, R .A. 1968. The effect of antibiotics of the neomycin group on experimental cutaneous leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. **62**: 54-62.
37. Neal, R. A., Allen, S., McCoy, N., Olliaro, P., Croft, S. L. 1995. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **35**: 577-584.
38. Olliaro, P.L., Taylor, W.R. 2003. Antimalarial compounds: from bench to bedside. *The Journal of Experimental Biology*. **23**: 3753-3759.
39. Orue, A., Pérez, J., Fuentes, J., Odreman, I., Serrano-Martin, X., Mendoza-Leon, A. 2007. *Leishmania* sp.: efecto de la glibenclamida, un bloqueador de canals de K , sobre el ciclo de vida in vitro. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud*. Vol.11, Supl. N°1.
40. Perez-Victoria, F.J., Sanchez-Canete, M.P., Seifert, K., Croft, S.L., Sundar, S., Castanys, S., Gamarro, F. 2006. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resistance Updates*. **9**: 26- 39.
41. Piscopo, T.V., Mallia, A.C. 2006. Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal*. **23**: 649-657.
42. Polonio, T., Efferth, T. 2008. Leishmaniasis: drug resistance and natural products. *International Journal of Molecular Medicine*. **31**: 277-286.

43. Ramos, H., Saint-Pierre-Chazalet, M., Bolard, J., Cohen, B.E. 1994. Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **38**: 1079-1084.
44. Ramos, H., Valdivieso, E., Gamargo, M., Dagger, F., Cohen, B.E. 1996. Amphotericin B kills unicellular *Leishmania* by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *The Journal of Membrane Biology*. **152**: 65-75.
45. Richard, J., Werbovetz, K. 2010. New antileishmanial candidates and lead compounds. *Current Opinion in Chemical Biology*. **12**: 447-455.
46. Roberts, C., McLeod, R., Rice, D., Ginger, M., Chance, M., Goad, L. 2003. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **33**: 129-142.
47. Rocha, L.G., Almeida, J.R., Macedo, R.O., Barbosa-Filho, J.M. 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*. **12**: 514-535.
48. Rojas, R., Valderrama, L., Valderrama, M., Varona, M.X., Ouellette, M., Saravia, N.G. 2006. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *The Journal of Infectious Diseases*. **193**: 1375-1383.
49. Seifert, K., Croft, S.L. 2006. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50**: 73-79.
50. Seifert, K., Munday, J., Syeda, T., Croft, S. 2011. *In vitro* interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **66**: 850–885.
51. Serrano-Martín, X., García-Marchan, Y., Fernández, A., Rodríguez, N., Rojas, H., Visbal, G., Benaim, G. 2009a. Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺

- homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **53**: 1403-10.
52. Serrano-Martín, X., Payares, G., De Lucca, M., Martínez, J.C., Mendoza-León, A., Benaim, G. 2009b. Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **53**: 5108–511.
53. Sharma, R., Pandey, A., Shivahare, R., Srivastava, K., Gupta, S., Chauhan, P. 2014. Triaino-indole-quinoline hybrid: a novel approach to antileishmanial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **22**: 298-301.
54. Singh, S., Sivakumar, R. 2004. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Infection and Chemotherapy*. **10**: 307-15.
55. Sundar, S., Chakravarty, J. 2008. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. **17**: 787-794.
56. Sundar, S., Jha, T.K., Thakur, C.P. 2007. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *The New England Journal of Medicine*: **356**: 2571-2581.
57. Sundar, S., Sinha, P.K., Rai, M. (2011). Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomized controlled trial. *Lancet*. **377**: 477-486.
58. Teklehaymanot, T., Giday, M. 2007. Ethnobotanical study of medicinal plants used by people in Zegie Peninsula, Northwestern Ethiopia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. **34**: 1746-4269.
59. Tekwani, B., Walker, L. 2006. 8-aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Current Opinion in Infectious Diseases*. **18**: 623-631.
60. Tempone, A.G., Da Silva, A.C., Brandt, C.A., Martinez, F.S., Borborema, S.E., Da Silceira, M.A., De Andrade, H. 2005. Synthesis and antileishmanial activities of

- novel 3-substituted quinolines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 1076-1080.
61. Trinconi, C.T., Juliana, Q., Jenicer K.U., Yokoyama-Yasunaka, C., Uliana, R.B. 2014. Combination Therapy with Tamoxifen and Amphotericin B in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. **58**: 2608–2613.
62. Van Griensven, J., Balasegaram, M., Meheus, F., Alvar, J., Lynen, L., Boelaert, M. 2010. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*. **19**: 184-194.
63. Vangadapus, S., Jain, M., Kaur, S., Singh, P. 2004. Ring- substituted quinolines as a potential anti-tuberculosis agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **12**: 2501-2508.
64. Vercesi, A., Rodrigues, R., Catisti, R., Docampo, R. 2000. Presence of a Na⁺/H⁺ exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalinization by antileishmanial drugs. *FEBS Lett*. **17**: 203-206.
65. Verma, N.K., Dey, C.S. 2004. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 3010-3015.
66. Vermeersch, M., Inocencio, R., Tote, K., Timmermans, J., Cos, P., Maes, L. 2009. *In Vitro* susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: Practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **38**: 3855–3859.
67. Wasunna, M.K. 2005. A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **73**: 871–876.
68. Wheeler, R.J., Gluenz, E., Gull, K. 2011. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Molecular Microbiology*. **30**: 647-662.

69. World Health Organization Leishmaniasis Disease Burden. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis>, 2010.
70. Wyllie, S., Cunningham, M., Fairlamb, A. 2004. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *The Journal of Biological Chemistry*. **286**: 39925-39932.
71. Yeates, C. 2002. Sitamaquine. *Current Opinion in Investigational Drugs*. **87**: 1446-1456.
72. Zhao, Y., Chen, Y.L., Chang, F., Tzeng, C. 2005. Synthesis and cytotoxic evaluation of certain 4-anilino-2-phenylquinolines derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **60**: 68-69.