



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGIA

Evaluación del efecto de compuestos derivados de ftalacinas, sobre *Leishmania braziliensis*: La superóxido dismutasa como posible blanco terapéutico.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Anamaría Alcalá como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutora: Dr. Yael García Marchan

CARACAS, VENEZUELA

ABRIL-2015

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios, por darme las fuerzas cada vez que me sentía cansada y la constancia para salir adelante y poder terminar esta etapa de mi vida.

A mi mama, Ana Núñez, quien ha estado a mi lado en cada llanto, cada caída, cada obstáculo superado y cada risa, quien siempre ha creído en mí aun cuando yo misma no creía. Sin ella no podría estar donde estoy ahora y es el motivo y la base de cada uno de mis logros alcanzados.

A mis familiares, que desde cerca y desde lejos, me han apoyado con sus palabras, sus mensajes y su amor. Doy gracias especialmente a mi tía, Neomir Núñez, por permitirme vivir en su casa y ser para mí como una segunda madre.

A mi tutora Yael García, una mujer increíble, que admiro como profesional y como persona, la cual ha sabido guiarme con paciencia y esmero, siendo un apoyo en todo momento.

A mí querido equipo de trabajo ByQPAT. Xenón Serrano, un ejemplo a seguir, luchador, honesto, director de este equipo de investigación, que me ha enseñado que el amor a tu país no se demuestra con palabras sino con acciones. Jorge Núñez, excelente investigador y compañero, con un corazón enorme he incondicional en todo momento. Jaques Leaños, por sus consejos y

correcciones, siempre asertivas. A Samuel Alfonzo por sus recomendaciones en Química, sus excelentes Té mañaneros y su apoyo. A Ali Mijoa, por sus consejos en Química. Y por último pero no menos importante agradezco a Johnatan Rodríguez, quien considero un amigo y una persona increíble, que me ayudo sin importar la hora ni las circunstancias, me hizo reír y me presto su hombro para llorar.

A todos muchísimas Gracias, que Dios los Bendiga hoy Mañana y Siempre.

RESUMEN

El término leishmaniasis hace referencia al conjunto de manifestaciones clínicas producidas por diversas especies del género *Leishmania spp.* Esta es una de las enfermedades más importantes transmitida por vectores. Según la OMS, cada año se diagnostican 2 millones de casos nuevos de leishmaniasis en el mundo, por lo que esta enfermedad parasitaria constituye un importante problema de salud pública. En Venezuela, el 80% de los casos reportados de leishmaniasis son producidos por *Leishmania braziliensis*. Las drogas que se utilizan actualmente para el tratamiento de esta enfermedad son Glucantime® y Pentostam® las cuales son extremadamente tóxicas, tienen severos efectos secundarios y son muy costosas. El objetivo de este estudio fue la selección de nuevos compuestos activos que ofrezcan una alternativa terapéutica para el tratamiento de la Leishmaniasis. A través de una colaboración con el laboratorio de Química Medicinal y Heterociclos de la Universidad Simón Bolívar a cargo del Dr. Simón E. López, se obtuvieron 22 compuestos derivados de Ftalacinas. Los mismos fueron evaluados mediante ensayo colorimétricos de viabilidad (MTT) sobre promastigotes de *L. braziliensis* demostrando que los derivados II4I, II4m y II8b fueron efectivos inhibiendo en más del 50% la proliferación de los parásitos en cultivo. Seguidamente, fueron evaluados sobre macrófagos BMDM con la finalidad de comprobar la inocuidad de los mismos sobre la célula hospedera. De los tres compuestos evaluados solamente II4I y II8b resultaron inocuos a concentraciones inferiores a 10µM. Mediante la realización de curvas de crecimiento se determinó el EC₅₀ para cada compuesto activo seleccionado, siendo estos para II4I=3,4µM y para II8b= 0,12µM. Una vez determinado el EC₅₀ para cada compuesto, fueron evaluados

sobre amastigotes intracelulares, estadio clínicamente importante de la enfermedad y fue posible observar la existencia de un efecto dosis-dependiente de los compuestos seleccionados sobre el porcentaje de macrófagos infectados y sobre la cantidad de amastigotes por macrófago con valores de EC_{50} sobre amastigotes intracelulares de $0,12\mu\text{M}$ para II4I y de $0,59\mu\text{M}$ para II8b. Así mismo, se determinó que el mecanismo de acción de aquellos compuestos con actividad antiparasitaria no resulta de la inhibición de la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa, blanco terapéutico para el cual fueron creados.

Palabras claves: *Leishmania braziliensis*, ftalacinas, Leishmaniasis, Superóxido Dismutasa.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Leishmaniasis	1
Leishmaniasis y su distribución mundial	2
Leishmaniasis en Venezuela	3
Vector y transmisión de la enfermedad	4
Morfología y Ciclo de vida del parásito	5
Manifestaciones clínicas de la Leishmaniasis	7
Tratamientos	10
Nuevas estrategias terapéuticas.....	13
Posibles blancos terapéuticos	14
ANTECEDENTES	19
OBJETIVOS	24
Objetivo General	24
Objetivos Específicos	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Materiales	25
Reactivos	25
Material biológico	25
Compuestos	26
Metodologías	29
Cultivo celular de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> .-----	29
Evaluación del efecto de compuestos derivados de ftalacinas, sobre la viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> .-----	30
Cultivo de Macrófagos BMDM y determinación del efecto de compuestos seleccionados sobre la viabilidad de estos macrófagos.-----	31

Evaluación del efecto de compuestos derivados de ftalacinas, sobre la proliferación de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> mediante la construcción de curvas de crecimiento parasitario <i>in vitro</i> .-----	33
Infección de macrófagos BMDM y determinación del efecto de compuestos seleccionados, sobre amastigotes intracelulares de <i>Leishmania braziliensis</i> .-----	34
Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa de <i>Leishmania braziliensis</i> en presencia y ausencia de ftalacinas. -----	35
RESULTADOS -----	39
DISCUSIÓN -----	50
CONCLUSIONES -----	56
BIBLIOGRAFÍA -----	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especies de <i>Leishmania</i> spp. de importancia médica. -----	1
Figura 2. Mapa de Distribución de las principales especies de <i>Leishmania</i> spp. en el mundo. -----	3
Figura 3. Formas flageladas o promastigotes de <i>Leishmania</i> spp. -----	5
Figura 4. Macrófago con amastigotes de <i>Leishmania</i> spp. -----	6
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.-----	7
Figura 6. Reacción Superóxido Dismutasa. -----	17
Figura 7. Estructuras cristalina de derivados de benzo[f]ftalazinas acomplejadas con Cu(II). -----	19
Figura 8. Estructura de las 1,4-bis(alquilaminas)benzo[g]ftalazina. -----	21
Figura 9. Derivados de ftalacinas funcionalizadas con imidazoles.-----	22
Figura 10. Derivados de ftalacinas evaluados sobre la viabilidad de promastigotes de <i>L. braziliensis</i> , mediante MTT.-----	39

Figura 11. . Actividad citotóxica de los compuestos derivados de ftalacinas, sobre la viabilidad de macrófagos BMDM mediante MTT. -----	40
Figura 12. Estructura del derivado de ftalacina II4I y II8b.-----	41
Figura 13. Efecto del derivado de ftalacina II4I sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. braziliensis</i> .-----	42
Figura 14. Efecto del derivado de ftalacina II8b sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. braziliensis</i> .-----	43
Figura 15. Efecto de derivados de ftalacinas sobre amastigotes intracelulares de <i>L. braziliensis</i> .-----	45
Figura 16. Perfil de elusión de las fracciones provenientes de la cromatografía en Q Sepharose™ de <i>L. braziliensis</i> .-----	46
Figura 17. Comparación del perfil de elusión con los geles obtenidos de acuerdo a las fracciones evaluadas. -----	47
Figura 18. Revelado de la actividad de la enzima SOD para las fracciones provenientes del homogenato.-----	48
Figura 19. Revelado de la actividad de la enzima SOD para las fracciones provenientes de la purificación.-----	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Derivados de Ftalacinas.-----	28
---	----

INTRODUCCIÓN

Leishmaniasis

El término leishmaniasis hace referencia al conjunto de manifestaciones clínicas producidas por parásitos eucarióticos unicelulares, monoflagelados, perteneciente al orden Kinetoplastidae, familia Trypanosomatidae, género *Leishmania* spp. El género *Leishmania* spp., está dividido en dos subgéneros, basados en el desarrollo del parásito en el intestino del insecto vector. De esta forma tenemos: el subgénero *Leishmania*, en el cual la forma promastigote se desarrolla en el intestino medio y anterior (región suprapylaria), y en el subgénero *Viannia*, en el cual los parásitos están restringidos al intestino posterior (región peripylaria). Aproximadamente 30 especies han sido identificadas, y al menos 20 de estos organismos son patogénicos para los mamíferos. (Morales, 2002) (Figura 1).

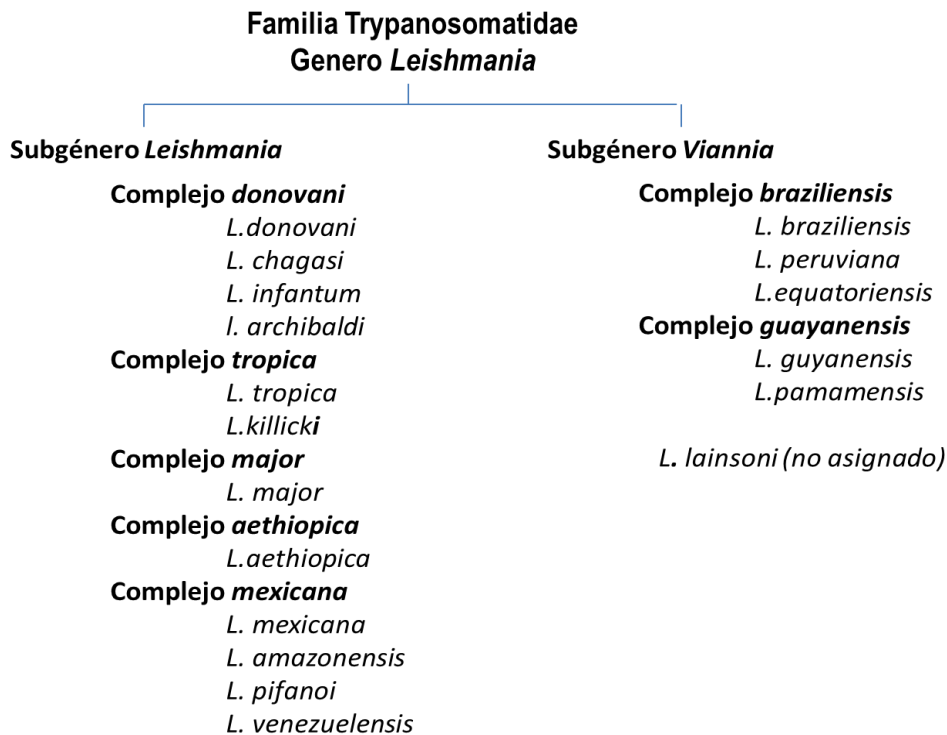


Figura 1. Especies de *Leishmania* spp. de importancia médica (Elaboración propia)

Leishmaniasis y su distribución mundial

La Leishmaniasis es considerada por la OMS como una de las seis parasitosis con mayores índices de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, afecta predominantemente a los más pobres, sobre todo en los países en desarrollo (OMS, 2007). Es endémica en 88 países, 22 países del Nuevo Mundo y 66 países del Viejo Mundo. Se estima que la población en riesgo es de 310 millones de personas. La prevalencia mundial es de 12 a 14 millones de pacientes y la incidencia es de más de un millón trescientos mil (1.300.000) casos nuevos por año, de los cuales 1 millón corresponden a leishmaniasis cutánea y 300 mil a leishmaniasis visceral (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/> [consulta: 20/03/15]).

La leishmaniasis es una enfermedad de alta prevalencia en regiones tropicales y subtropicales, la distribución geográfica de la leishmaniasis está limitada por la distribución del vector (Figura 2). El número de casos de leishmaniasis ha ido en aumento debido al inadecuado control de vectores y reservorios en las zonas endémicas, al aumento mundial en los niveles de VIH (SIDA) el cual permite tanto el desarrollo como el establecimiento de la enfermedad de manera más rápida y violenta, la emergencia en la resistencia al tratamiento y el impacto reciente de los cambios climáticos, que inciden en la distribución y el comportamiento de los vectores implicados en la transmisión (Desjeux, 2004; Montalvo y col., 2012).

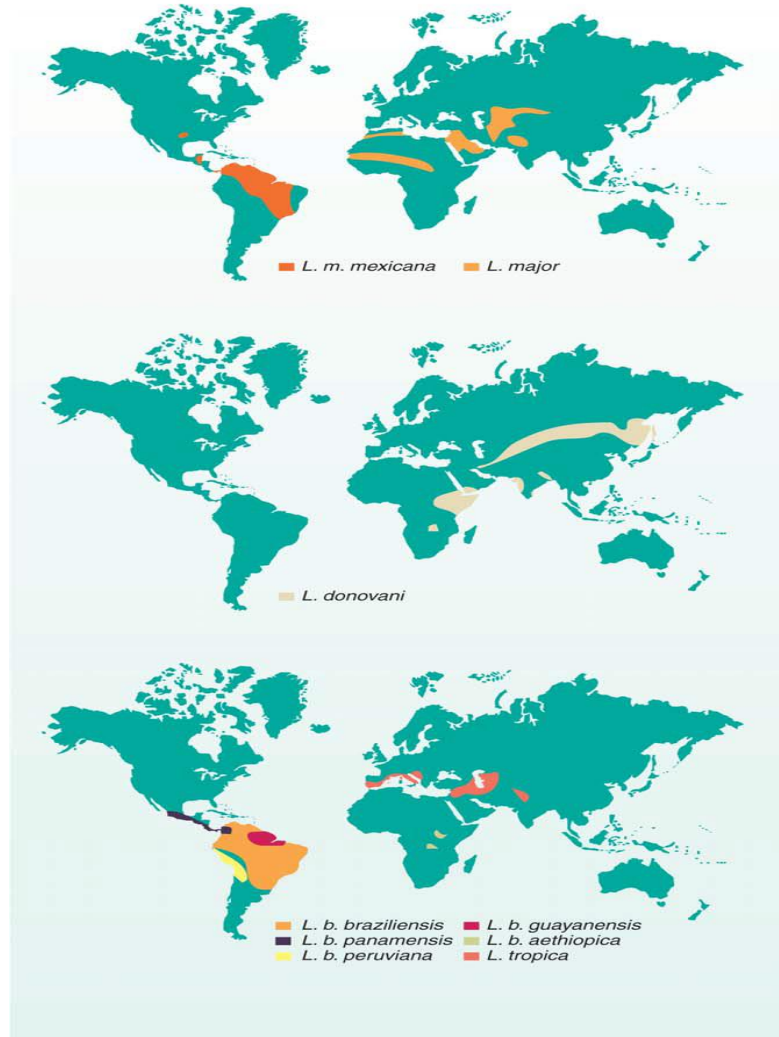


Figura 2. Mapa de Distribución de las principales especies de *Leishmania* spp. en el mundo (Pereira y Pérez, 2002).

Leishmaniasis en Venezuela

En Venezuela la prevalencia de esta enfermedad se vincula con las condiciones climatológicas y fisiográficas que permiten el desarrollo completo de los insectos trasmisores. Se han identificado casos de leishmaniasis cutánea en distintas áreas endémicas del país como en los valles del sistema montañoso de la Costa, la depresión de Yaracuy, algunas regiones de los llanos y de los Andes, el sur del Orinoco, la zona montañosa y boscosa de Táchira, Mérida, Trujillo, Lara, Miranda y Sucre, además de los estados

Carabobo y Aragua. Algunas regiones fueron consideradas de alta endemicidad como Miranda, Yaracuy, sur de Bolívar, Trujillo y sur del Zulia. En el bienio 2008-2009, un total de 4.640 casos de las diferentes formas clínicas de leishmaniasis cutánea fueron diagnosticados en Venezuela, con una media de 2.320 casos por año, y una tasa promedio anual de 8,26 por 100.000 habitantes. Se registraron casos en todas las entidades federales del país, menos en Nueva Esparta. En este periodo, los estados con mayor número de casos fueron Lara con 910 (19,61%), Miranda con 650 (14,01%) y Táchira con 488 (10,52%). En cuanto a las formas clínicas se observó un predominio de la leishmaniasis cutánea localizada con 97,84% de los casos generada por *Leishmania braziliensis* (De Lima y col., 2011).

Vector y transmisión de la enfermedad

La leishmaniasis es una enfermedad de transmisión vectorial. Los vectores de todas las especies de *Leishmania spp.* descritas son hembras hematófagas de la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae y de las 500 especies conocidas, solo 31 se identifican como vectores de especies patógenas y 43 como vectores probables, pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. (Montalvo y col., 2012). En nuestro país, existen 100 especies de mosquitos del género *Lutzomyia*, 30 de ellas son antropófilas (Oletta y col., 2011). Al picar el mosquito flebótomo a un animal vertebrado infectado, el insecto ingiere juntamente con la sangre y la linfa, macrófagos parasitados. Mediante una nueva picada del vector los parásitos son inoculados a un nuevo hospedador sano (el hombre u

otro animal susceptible) y este constituye el principal mecanismo de transmisión (Montalvo y col., 2012; Salomón, 2009).

Morfología y Ciclo de vida del parásito

La morfología de *Leishmania spp.* viene determinada por un ciclo de vida complejo ya que los parásitos están expuestos a diferentes ambientes en su ciclo: uno extracelular con la morfología promastigote que se desarrolla en el aparato digestivo del hospedador invertebrado (flebótomo) y un estadio intracelular con la forma amastigote que aparece en el hospedador vertebrado (Figura 5) (Ramírez, 2012).

El promastigote tiene forma alargada de 15 a 20 μm de longitud y presenta un flagelo libre en su parte anterior (Figura 3). Presenta un núcleo central, ribosomas, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, una única mitocondria y el kinetoplasto que aparece como un cuerpo electro denso en la zona anterior (Boutaleb, 2010).



Figura 3. Formas flageladas o promastigotes de *Leishmania spp.* Coloración de Giemsa (1.200 aumentos). (Canese y col., 2011)

El morfotipo amastigote se observa en los tejidos parasitados de los hospedadores vertebrados, generalmente en el interior de las células del

sistema mononuclear (macrófagos) (Figura 4). En el interior de estas células se pueden encontrar los amastigotes englobados en una vacuola (vacuola parasitófora) que se forma tras la fusión del lisosoma y el fagosoma una vez que el parásito ha sido internalizado. Los amastigotes presentan forma ovoide con un tamaño comprendido entre 2 y 5 μm de diámetro. Estas formas presentan un núcleo central y un kinetoplasto alargado pudiéndose apreciar la existencia de un bolsillo flagelar y un flagelo vestigial (Boutaleb 2010).

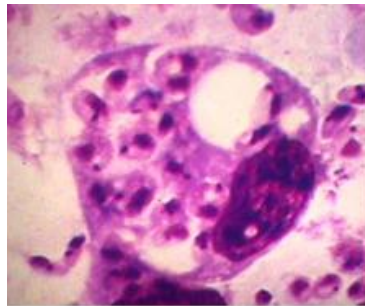


Figura 4. Macrófago con amastigotes de *Leishmania* spp, en un frotis de médula ósea de una persona enferma por LV. Coloración Giemsa (1.200 aumentos). (Canese y col., 2011)

Cuando el flebótomo ingiere sangre con macrófagos infectados con amastigotes de un mamífero parasitado comienza el desarrollo del parásito en el interior de su aparato digestivo. Durante un periodo inicial de 6 a 9 días (dependiendo de la especie) *Leishmania* spp. se desarrolla diferenciándose en distintos estadios, hasta convertirse en promastigotes metacíclicos, en un proceso conocido como metaciclogénesis. La sangre de la que se alimenta el vector permanece contenida inicialmente en la región abdominal del aparato digestivo, al tercer día de desarrollo los parásitos migran hacia el intestino. Una vez en el intestino los promastigotes avanzan hacia la zona bucal. La transmisión de la infección se produce cuando el flebótomo infectado se

alimenta de un nuevo hospedador vertebrado y le inocula promastigotes metacíclicos durante la ingesta (Echenique y col., 2010).

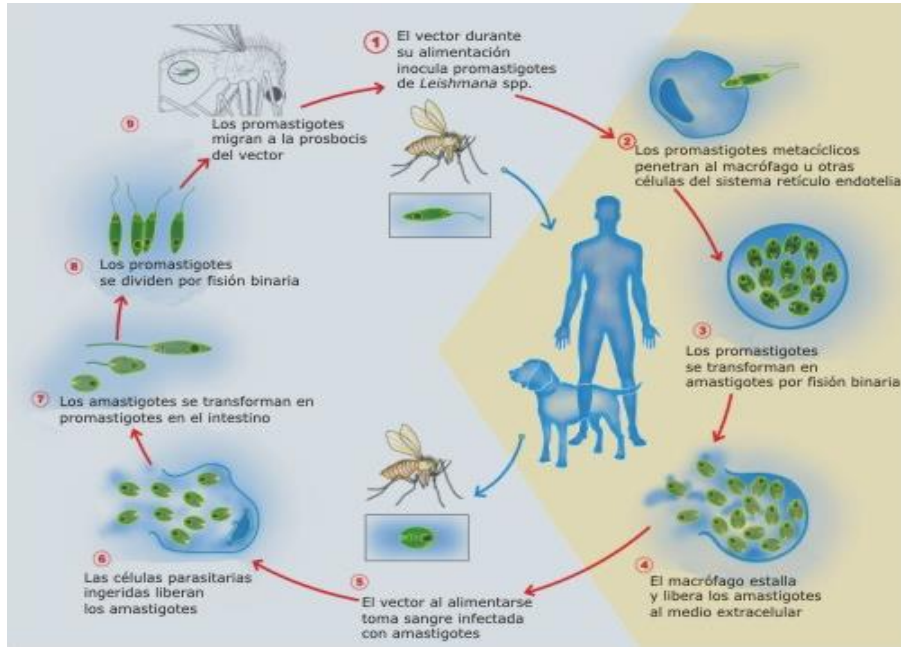


Figura 5. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Montalvo y col., 2012).

Manifestaciones clínicas de la Leishmaniasis

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis son variables y dependen, por lo general de varios factores entre los cuales la susceptibilidad genética del hospedador, el contexto inmunológico en que se produce la infección y la especie de *Leishmania* spp. son los más importantes (Montalvo y col., 2012). Se describen 3 formas clínicas: 1) Leishmaniasis cutánea; 2) Leishmaniasis mucocutánea y 3) Leishmaniasis visceral.

1) Leishmaniasis cutánea: La leishmaniasis cutánea es la forma más frecuente del padecimiento. Puede presentarse en dos formas clínicas con pronóstico y características inmunológicas opuestas: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD). LCL se

distingue por la presencia de úlceras únicas o múltiples, redondeadas, de bordes indurados, fondo limpio e indoloro que aparecen 15 a 20 días después de la picadura del vector infectado. Algunas veces los pacientes con LCL curan de manera espontánea en un lapso de seis meses a dos años, excepto cuando la lesión ocurre en la oreja, donde es crónica y mutilante. En el polo opuesto se encuentra la LCD, que se caracteriza por falta de respuesta inmune celular hacia antígenos de *Leishmania spp.*, lo que permite la diseminación del parásito por el líquido tisular, la linfa o la vía sanguínea con desarrollo de lesiones nodulares en toda la piel, salvo en el cuero cabelludo. Las personas infectadas con VIH pueden presentar casos excepcionalmente graves y la enfermedad es más difícil de curar. En el continente europeo, sobre todo en el este de África formas LCL y LCD las produce *L. aethiopica*. En el continente americano varias especies pueden causar ambas formas clínicas: *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis* y *L. braziliensis* (García- Almagro, 2005; Becerril, 2008).

- 2) Leishmaniasis mucocutánea: La leishmaniasis mucocutánea (LMC) se caracteriza por invasión y destrucción de la mucosa nasofaríngea y puede ser muy desfigurante. Esta forma clínica se desarrolla después que desaparecen las lesiones cutáneas y en ocasiones puede presentarse hasta 20 años después. Las lesiones se caracterizan por tener escasos parásitos y los daños son secundarios a la reacción inflamatoria que ocurre en las mucosas nasal, bucal y faríngea, y llevan a la degeneración del tabique nasal. Los tratamientos son muy prolongados y los pacientes casi siempre

sufren el rechazo de su comunidad debido a las destrucciones mutilantes que les confiere un aspecto de leprosos. Las especies causantes de esta forma clínica pertenecen al complejo *L. braziliensis*: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. peruviana* (García- Almagro, 2005; Becerril, 2008).

- 3) Leishmaniasis visceral: En la leishmaniasis visceral (LV) el parásito invade órganos internos (bazo, hígado y médula ósea) y produce hepatoesplenomegalia, fiebre intermitente, pérdida de peso, anemia y caquexia. En la India, la enfermedad se conoce como kala-azar o enfermedad negra en virtud de la hiperpigmentación observada en pacientes de esta región. La LV es letal en 100% de los casos si no recibe tratamiento, y aun con éste la mortalidad puede llegar a 15%. En la región del Mediterráneo, la LV ha surgido como un problema de salud pública, sobre todo en individuos inmunosuprimidos como los pacientes con VIH. En Venezuela la LV es menos frecuente, sin embargo, se han identificado casos en las zonas rurales y en los terrenos aluvionales por debajo de 7 metros del nivel del mar (Padrón y col., 2007). Después de la recuperación de la leishmaniasis visceral, es posible observar la leishmaniasis cutánea posterior a kala-azar, que cursa con nódulos cutáneos que contienen abundantes macrófagos infectados, los cuales pueden curarse con terapia muy prolongada. La LV es producida por las especies *L. donovani*, *L. chagasi* y *L. infantum* (Becerril, 2008; Echenique y col., 2010).

Tratamientos

Actualmente la quimioterapia es el tratamiento más efectivo contra esta parasitosis. El establecimiento de una quimioterapia idónea contra la leishmaniasis ha resultado difícil, ya que el éxito de la misma varía con la especie de *Leishmania* spp., la severidad de la enfermedad, el lugar donde se infecta el individuo y el estado nutricional e inmunológico del paciente. Se han descrito más de 20 fármacos como eficientes para el tratamiento de la leishmaniasis; sin embargo, sólo algunos son utilizados en el manejo clínico de esta patología. Los medicamentos más utilizados contra la leishmaniasis, están principalmente dirigidos al estadio intracelular del parásito (Padrón y col., 2007)

Los fármacos recomendados para el tratamiento de esta enfermedad son:

Antimoniales

Los antimoniales pentavalentes constituyen la primera línea de elección para el tratamiento clásico de todas las formas de leishmaniasis. En el mercado se encuentra el estibogluconato de sodio (Pentostam®) y el antimonio de N-metilglutamina (Glucantime®). La administración es por vía parenteral, intramuscular o intravenosa. Estos fármacos son altamente tóxicos, los efectos adversos más comunes y principales responsables de la interrupción del tratamiento, son los relacionados con el sistema músculo esquelético, como mialgias y artralgias, en ocasiones severas, con mayor incidencia en pacientes mayores; trastornos cardíacos y hepáticos, en ocasiones fatales, además de cefalea, anorexia, náuseas y fiebre (Vélez y col., 2012). El mecanismo de acción de los compuestos antimoniales se basa en su capacidad para inhibir

selectivamente enzimas necesarias para la glicolisis y la oxidación de los ácidos grasos del parásito. El compuesto actúa sobre los amastigotes de *Leishmania spp.*, inhibiendo la actividad glicolítica y la oxidación de los ácidos grasos a nivel de los glicosomas, acompañándose esto de una reducción neta en la generación de adenosina trifosfato y guanidina trifosfato. A pesar de su toxicidad los fármacos antimoniales logran la cura clínica de un 90% de los casos, aunque la remisión de los síntomas y la reaparición de la enfermedad ocurren con frecuencia. Además en los últimos años se ha incrementado el número de resistencias por lo que se ha limitado su uso (Boutaleb 2010). En Venezuela la droga de elección, independientemente del parásito infectante, es el Glucantime®. (Padrón y col., 2007).

Anfotericina B

La Anfotericina B, la cual es considerada una droga de segunda elección, es un antibiótico poliénico antifúngico y antileishmanico obtenido del microorganismo *Streptomyces nodosus*, que se administra por vía parenteral (intravenosa) (Yépez y Scorza, 2003). Esta droga se reserva para los casos de leishmaniasis visceral y mucocutánea que no responden al tratamiento convencional con antimoniales pentavalentes (Canese y col., 2011). Además de ser muy costosa, es altamente tóxica, y presenta efectos adversos como nefropatías, hipocalcemia refractaria, miocarditis e incluso la muerte, anorexia, náuseas, vómito, fiebre y tromboflebitis en el sitio de la aplicación (Vélez y col., 2012). El mecanismo de acción de la anfotericina B radica en la unión a los esteroides y fosfolípidos de la membrana celular de los parásitos leishmánicos, preferiblemente a los esteroides sustituidos en el C24, tales como el ergosterol

que es el principal esteroles en las membranas plasmáticas de estos flagelados. De esta forma se perturba irreversiblemente la permeabilidad y el transporte de membrana, formándose poros por donde se pierden iones y otras moléculas del citoplasma del parásito, afectando así la vida del protozoo (Yépez y Scorza, 2003). Sin embargo, debido a la similitud existente entre el ergosterol y el colesterol de las células de mamíferos, pueden producirse uniones inespecíficas generando daños en el hospedador (Boutaleb 2010).

Pentamidina

La Pentamidina es un derivado aromático de la diamidina, de administración intramuscular. Sus efectos adversos son: hipotensión, diabetes mellitus, hipoglicemia severa, miocarditis y toxicidad renal. Es un tratamiento recomendado en pacientes en los cuales los antimoniales están contraindicados. Se cree que su mecanismo de acción es la interacción con el ADN del kinetoplasto, inhibiendo la topoisomerasa II. En ensayos clínicos para leishmaniasis cutánea ha mostrado una tasa de curación de hasta el 98%. (Vélez y col., 2012; Botero y Restrepo, 2012).

Miltefosina

La Miltefosina es un alquil-fosfolípido análogo de la alquilofosfocolina. Su administración es por vía oral. Como efectos adversos la miltefosina produce vómitos y diarrea hasta en 60% de los pacientes y aumento reversible de las transaminasas y de la creatinina. Es teratogénico con vida media prolongada, por lo que en mujeres en edad fértil debe garantizarse una adecuada contracepción durante el tratamiento y por 3 meses después de terminado el

mismo. Se ha postulado que su mecanismo de acción es producto de alteraciones en el metabolismo de los éster-lípidos, se propone que la miltefosina inhibe específicamente el proceso de alquilación de la enzima acil-CoA transferasa, la cual es clave en los procesos de remodelación de diversos éster-lípidos de la membrana de *Leishmania spp.* Serrano-Martín y col., (2009), demostraron que esta droga provoca un aumento de las concentraciones de Ca^{+2} intracelular del parásito, probablemente debido a la apertura de un canal de Ca^{+2} tipo T. Los estudios pre-clínicos sugieren más de un 95% de cura total en casos de leishmaniasis visceral y entre 53-91% en la forma cutánea. (Vélez y col., 2012; Oletta y col., 2011).

Teniendo en cuenta los diversos efectos adversos de las drogas utilizadas para el tratamiento de la leishmaniasis, el alto costo de los mismos además de los fenómenos de resistencia parasitaria asociados a estas drogas, resulta urgente el desarrollo de nuevos fármacos más eficaces menos costoso y menos tóxicos en la lucha contra esta enfermedad.

Nuevas estrategias terapéuticas

En los últimos años, la tendencia respecto al desarrollo de nuevos fármacos está cambiando de una detección aleatoria hacia un diseño racional o dirigido hacia enzimas o moléculas “blanco”. Las investigaciones realizadas en las dos últimas décadas en bioquímica y biología molecular en tripanosomatidos han revelado algunos “blancos” terapéuticos potenciales. Entre los blancos terapéuticos más importantes destacan: el metabolismo de

glucosa, homeostasis del calcio, el metabolismo de esteroides, tripanotona reductasa, superóxido dismutasa, etc. (Boutaleb, 2010).

Posibles blancos terapéuticos

Inhibición del metabolismo de glucosa

La degradación de glucosa a piruvato es el único suplemento de ATP de los tripanosomátidos que viven en la sangre de mamíferos. Por lo que, la inhibición de la glucólisis conlleva a la muerte rápida de estos parásitos. Además, la gran separación evolutiva entre estos tripanosomas y humanos, y la inusual organización de la ruta glucolítica (compartimentación en glicosomas) en los parásitos (Castilla, 1994), han dotado a las enzimas glicosomales de estos parásitos, de propiedades distintivas que pueden ser explotadas, sobre la base de su estructura o mecanismo catalítico, para el diseño de inhibidores selectivos (Castilla y col., 1996; Fernández-Ramos y col., 2000).

La homeostasis del calcio

Entre otros “blancos” terapéuticos potenciales se encuentra la regulación de la homeostasis del calcio en los parásitos. El Ca^{2+} ha sido reconocido como un mensajero señal esencial en todos los eucariotes, desde mamíferos hasta parásitos. La perturbación de la homeóstasis del Ca^{2+} en todas las células normalmente conduce a efectos letales que conllevan a necrosis o apoptosis. Este es también el caso en tripanosomatidios, tales como *Trypanosoma cruzi*, el causante del mal de Chagas, *Trypanosoma brucei*, que produce la enfermedad del sueño, y de *Leishmania spp.*, responsables de la leishmaniasis (Benaim y col., 2012).

Metabolismo de esteroides

El metabolismo de esteroides de *L. braziliensis* también ofrece diferencias con la contraparte mamífera particularmente en sus productos finales. Inhibidores de la biosíntesis de ergosterol han demostrado su eficacia antiparasitaria "in vitro" a distintos niveles de la ruta, ejemplo de ello: en la C-14 desmetilación dependiente de citocromo P-450 del lanosterol (azoles: imidazol; derivados triazoles: ketoconazol) (Boutaleb, 2010) y sobre la escualeno sintetasa o escualeno epoxidasa (derivados de Benzimidazol, derivados de Quinolinas) (Bompart y col., 2013). A pesar de que algunos de los compuestos mencionados mostraron menor efectividad que los fármacos empleados como referencia, tienen a su favor que los efectos secundarios también son menores, además que ya existen fármacos en el mercado o en desarrollo como antimicóticos, antifúngicos o anticancerígenos, con lo que se disminuyen costos y tiempos de investigación y producción. (Boutaleb, 2010).

Inhibidores del metabolismo de la tripanotina

Los tripanosomátidos poseen un sistema redox centrado en el tripanotina (N1,N8-bis(glutationil)-espermidina); un tior de bajo peso molecular que consiste en dos moléculas de glutatión unidos por espermidina. En estos organismos el tripanotión es mantenido como dihidrotripanotión por la actividad de la enzima tripanotión reductasa (TR). Debido a la función esencial del tripanotión en *L. braziliensis* y a las diferencias bioquímicas existentes con su contraparte mamífera (glutatión) y con las enzimas involucradas en su metabolismo, además de la determinación de la estructura de su centro activo,

esta se considera como uno de los blancos farmacológicos para la búsqueda y diseño de inhibidores de la misma como una alternativa de nuevos tratamientos anti-leishmanicos (Boutaleb, 2010).

La Superóxido Dismutasa

Se sabe que la entrada de un parásito en su hospedador desencadena una serie de mecanismos dirigidos a su eliminación. La producción de radicales libres constituye uno de estos mecanismos, el cual consiste en la generación de un estrés oxidativo capaz de alterar la integridad de las membranas, proteínas y ácidos nucleicos del parásito, este daño celular está asociado a la presencia de altas presiones (o tensiones) de oxígeno y otras moléculas derivadas (fundamentalmente los aniones superóxido e hidroxilo: O_2^- , OH^- y el peróxido de hidrogeno, H_2O_2) (Sies, 1985). Los parásitos han desarrollado mecanismos detoxificantes de alta eficacia a fin de adaptarse y asegurar de este modo la supervivencia y establecimiento dentro del hospedador (Luque y col., 2000). La enzima Superóxido Dismutasa (SOD) es considerada como la principal y casi única línea de defensa de los protozoos frente al estrés oxidativo puesto que los sistemas catalasa y glutatión peroxidasa, que constituyen las principales defensas enzimáticas en la mayoría de eucariotas, son extremadamente deficientes en protozoos (Carrasco, 2007).

La enzima SOD cataliza la degradación del ión tóxico superóxido (O_2^-) a oxígeno molecular y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (García, 2012). Según la siguiente reacción:

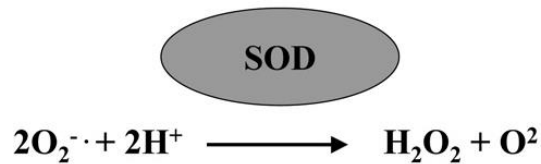


Figura 6. Reacción Superóxido Dismutasa.

(<http://cienciacebas.wordpress.com/2013/01/>)

Las SOD se han clasificado en tres tipos de acuerdo con el cofactor metálico al que aparecen unidas: cobre-zinc (Cu-ZnSOD), manganeso (MnSOD) y hierro (FeSOD). Mientras que las Cu-Zn y las Mn están presentes en el citosol y las mitocondrias, respectivamente, de la mayoría de organismos eucariotas, las FeSOD son típicas de procariotas y plantas superiores (Carrasco, 2007).

Experimentos de localización subcelular han demostrado que existen diferentes isoenzimas dependiendo de la especie de tripanosomatido y a su vez las distintas isoenzimas tienen localizaciones específicas dentro de la célula. El fenómeno de la compartimentación adquiere una especial importancia tomando en cuenta que el principal papel de la SOD consiste en la detoxificación de aniones superóxido para proteger las distintas macromoléculas y orgánulos del daño oxidativo (Carrasco, 2007). Recientemente, cuatro actividades SOD con localizaciones distintas (citosólica, glicosomal y mitocondrial) han sido descritas y clonadas en *T. brucei* (Dufernez y col., 2006). La SOD es presumiblemente sintetizada a nivel citoplasmático, pudiendo permanecer ahí o ser transportada hasta el interior de ciertos orgánulos, como sucede en los casos de *T. brucei* (Dufernez y col., 2006,

Carrasco, 2007) y *Leishmania spp.* (Paramchuk y col., 1997; Genetu y col., 2006). En definitiva, la presencia de varios isoenzimas en diferentes localizaciones dentro de la célula asegura una acción muy eficaz frente a un eventual aumento intracelular de los niveles de especies reactivas del oxígeno, manteniendo un ambiente reductor favorable dentro de la célula (Carrasco, 2007).

Experimentalmente, es posible discernir de manera rápida y fiable el cofactor metálico ligado a las SOD mediante exposición de la enzima a inhibidores específicos, como son el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el cianuro (CN^-). Las isoenzimas que contienen Fe son inhibidas por el H_2O_2 , pero no por el CN^- , mientras que aquellas que fijan átomos de Cu-Zn o Mn en su sitio activo son inhibidas por ambos compuestos. Concretamente la superóxido dismutasa de hierro (FeSOD), es la enzima normalmente asociada con tripanosomatidos y juega un papel relevante como defensa antioxidantes de parásitos que originan la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis. (Boutaleb, 2010; Paramchuk y col., 1997). Estudios llevados a cabo en estos parásitos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae han corroborado la presencia de al menos dos actividades SOD, como sucede en los casos de *Leishmania spp.* (Paramchuk y col., 1997; Genetu y col., 2006), y *T. cruzi* (Villagran y col., 2005).

Las SOD trabajan de manera coordinada con el resto de sistemas, originando toda una serie de reacciones destinadas a eliminar del ambiente el exceso de especies reactivas de oxígeno (EAO) y consecuentemente, evitar un daño celular irreversible. Las diferencias existentes a nivel del catión metálico

entre las isoformas protozoarias y de sus hospedadores, ascienden a la SOD hasta una privilegiada posición desde cuyo conocimiento se hace factible su empleo como marcador molecular para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y diferenciación de especies, así como potenciales dianas terapéuticas para el diseño de nuevos fármacos anti-*Leishmania* susceptibles de aprovechar las diferencias estructurales existentes entre las FeSOD protozoarias y la Cu-ZnSOD de la mayoría de eucariotas (Carrasco, 2007).

ANTECEDENTES

Por todo lo anteriormente expuesto, la SOD se convierte en un excelente blanco para el diseño de fármacos leishmanicidas cuya actividad estará determinada por la posible interacción del fármaco con el metal de la enzima, siendo importante el diseño de núcleos que puedan presentar buenas interacciones con estos metales (Romero, 2013). Uno de los sistemas empleados recientemente para promover este tipo de actividad son los derivados de benzoftalacinas y ftalacinas funcionalizados con diaminas alifáticas, estos compuestos presentaron la capacidad de formar cristales con sales de cobre (II) (Figura 7) (Rodríguez-Ciria y col., 2007; Sanz y col., 2008). Además, estos derivados han mostrado una excelente actividad inhibitoria y excelentes valores de actividad antichagásica y antileishmanica (Sánchez-Moreno y col., 2011; Sánchez-Moreno y col., 2012).

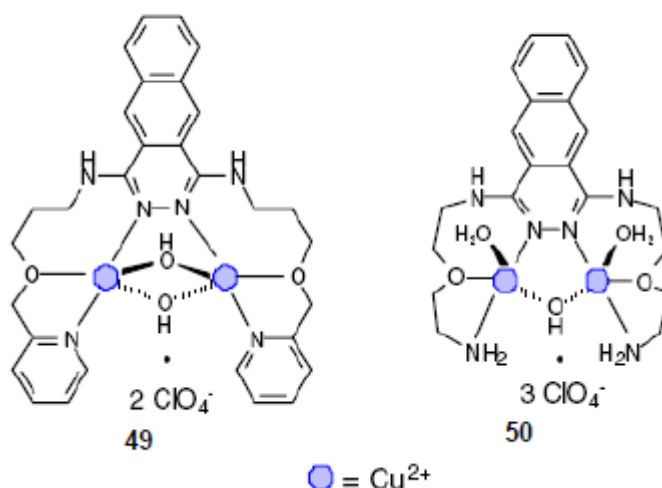


Figura 7. Estructuras cristalina de derivados de benzo[ftalacinas acomplejadas con Cu(II).

(Romero, 2013)

El núcleo de ftalacina ha sido poco explotado como estructura base para el diseño de compuestos con actividad anti-tripanosomatidos. Sin embargo, existen ciertas evidencias que sugieren que este sistema puede tener una influencia significativa para esta actividad, no solo por su potencial actividad de inhibición de la SOD (Rodríguez-Ciria y col., 2007; Sanz y col., 2008; Romero 2013), sino por su potencial función como grupo transportador a través de las membranas del parásito (Carter y col., 1993; Carter y col., 1995; Romero, 2013), además de una posible acción sobre el catabolismo de la glucosa de acuerdo con la estructura de las cadenas laterales de especies de parásitos como *Leishmania infantum* y *Leishmania braziliensis* (Sánchez-Moreno y col., 2012).

En 2007, Sánchez-Moreno y col., diseñaron y sintetizaron una serie de derivados de 1,4-bis(alquilaminas)benzo[g]ftalazinas como inhibidores de SOD (Figura 8), los cuales presentaron la formación de complejos dinucleares con el cobre (II), un factor químico muy importante para la potencial actividad de estos derivados, ya que la función de la SOD depende del centro metálico (Fe, Cu o Zn). Los resultados obtenidos mostraron que estos derivados presentaron una excelente actividad anti-*Trypanosoma cruzi*, especialmente los derivados con nitrógenos incorporados en el grupo R respecto a aquellos cuyo grupo R con hidroxilo terminales. Además, estos derivados mostraron valores de EC₅₀ sobre cepas de epimastigotes comparables al nifurtimox, fármaco utilizado para tratar esta parasitosis. (Romero, 2013.)

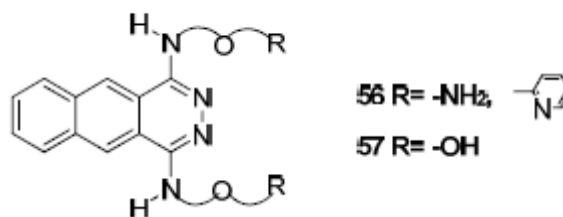


Figura 8. Estructura de las 1,4-bis(alquilaminas)benzo[g]ftalazina. (Rodríguez-Ciria y col., 2007)

Posteriormente, el mismo grupo de investigación en 2008 estudió la potencial actividad anti-*Trypanosoma cruzi* de 1,4-bis(alquilaminas)benzo[g]ftalazinas y 1-alquilamino-4-clorobenzo[g]ftalazinas funcionalizadas con imidazoles, encontrando resultados “in vitro” con valores de EC₅₀ inferiores al benznidazol (Romero, 2013). Adicionalmente, se comprobó que todos los derivados presentaban una excelente actividad inhibitoria sobre la SOD, lo que indica la estrecha relación entre la actividad inhibitoria SOD y la actividad anti-*Trypanosoma cruzi*. (Sanz y col., 2008; Sánchez-Moreno y col., 2011)

Luego, a finales del año 2012, este mismo grupo de investigación publicó la síntesis y evaluación biológica de derivados de ftalacinas funcionalizados con imidazoles (Figura 9) análogos del trabajo anterior esta vez sobre *Leishmania infantum* y *Leishmania braziliensis*. En este trabajo demuestran que sus derivados de ftalacina presentan valores de EC₅₀ dos y tres veces menores a la droga comercial Glucantime, probada sobre el estadio clínicamente importante de la enfermedad, el amastigote intracelular, además demuestran un efecto inhibitorio de la SOD que podría relacionarse con la inhibición de la proliferación parasitaria (Sánchez-Moreno y col., 2012).

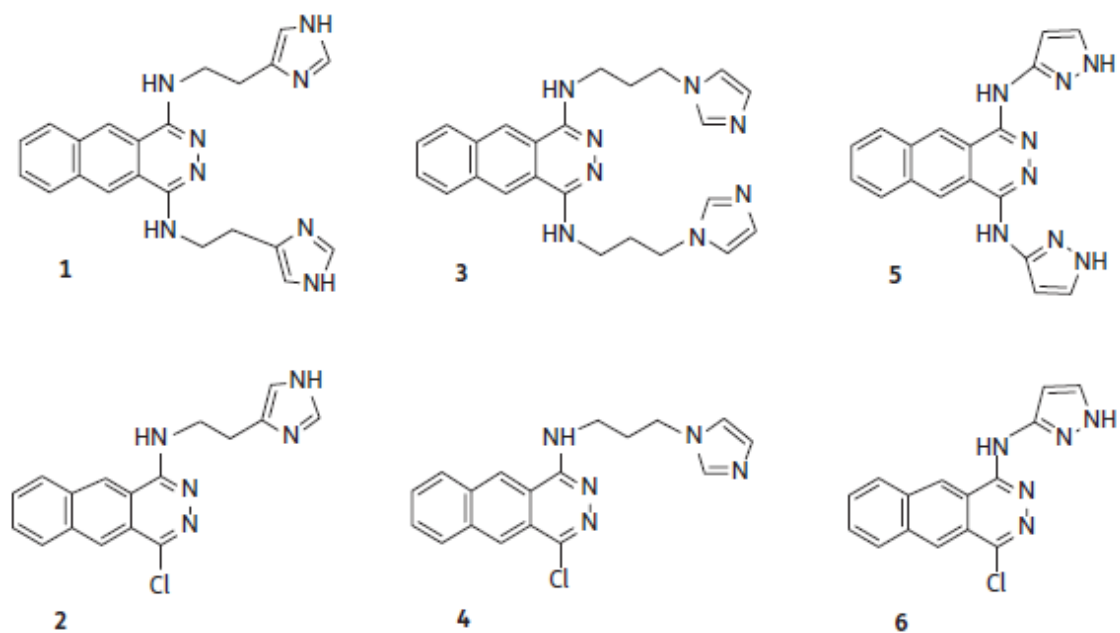


Figura 9. Derivados de ftalacinas funcionalizadas con imidazoles (Sánchez-Moreno y col., 2012)

Por todo lo anteriormente mencionado el objetivo de este estudio, fue determinar el efecto de 22 nuevos compuestos derivados de ftalacinas sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal y Heterociclos, departamento de Química, de la Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela, sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes de *Leishmania braziliensis* que ofrezcan una alternativa terapéutica para el tratamiento de la Leishmaniasis. Así como, tratar de relacionar esta actividad antiparasitaria con la inhibición de la SOD de este parásito.

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de compuestos derivados de ftalacinas sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes de *Leishmania braziliensis* y su posible efecto inhibitorio sobre la Superóxido Dismutasa.

Objetivos específicos

- 1- Evaluar 22 compuestos derivados de ftalacinas sobre la proliferación de promastigotes de *Leishmania braziliensis* y seleccionar aquellos con mayor potencial antiparasitario.
- 2- Evaluar los compuestos seleccionados sobre la viabilidad de macrófagos BMDM y seleccionar aquéllos con menor efecto citotóxico sobre la célula hospedera (macrófagos).
- 3- Evaluar los compuestos seleccionados sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*.
- 4- Determinar la actividad enzimática de la superóxido dismutasa de *Leishmania braziliensis* en presencia y ausencia de ftalacinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Reactivos

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

Material biológico:

Filogenia del parásito:

Phylum: Euglenozoa

Clase: Kinetoplastea

Subclase: Metakinetoplastina

Orden: Trypanosomatida

Género: *Leishmania*

Subgénero: Viannia

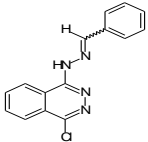
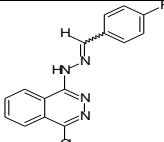
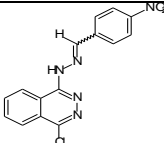
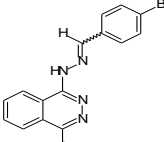
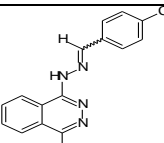
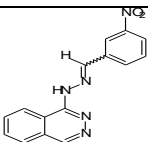
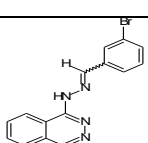
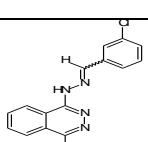
Especie: *braziliensis*

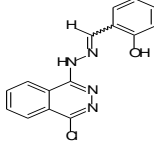
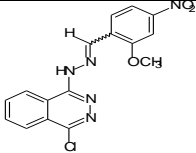
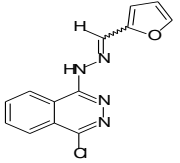
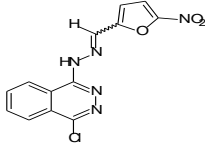
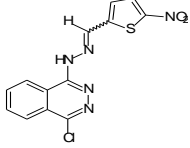
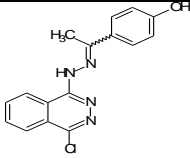
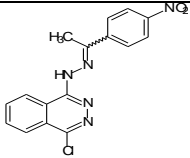
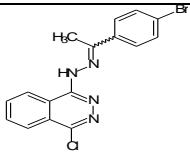
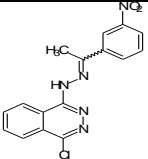
Cepa: Paciente 1

Origen: Venezuela

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

Compuestos:**Derivados de Ftalacinas**

Denominación	Estructura	Formula Molecular	Peso Molecular
II4a		$C_{15}H_{11}N_4Cl$	282,45
II4b		$C_{15}H_{10}N_4ClF$	300,45
II4c		$C_{15}H_{10}N_5ClO_2$	327,45
II4d		$C_{15}H_{10}N_4ClBr$	361,45
II4e		$C_{15}H_{10}N_4Cl_2$	316,90
II4f		$C_{15}H_{10}N_5ClO_2$	327,45
II4g		$C_{15}H_{10}N_4ClBr$	361,45
II4h		$C_{15}H_{10}N_4Cl_2$	316,90

II4i		$C_{15}H_{11}N_4ClO$	298,45
II4j		$C_{16}H_{12}N_5ClO_3$	357,45
II4k		$C_{13}H_9N_4ClO$	272,45
II4l		$C_{13}H_8N_5ClO_3$	327,45
II4m		$C_{13}H_8N_5ClO_2S$	333,45
II5a		$C_{16}H_{13}N_4ClO$	312,45
II5b		$C_{16}H_{12}N_5ClO_2$	3341,45
II5c		$C_{16}H_{12}N_4ClBr$	375,45
II5d		$C_{16}H_{13}N_4ClO$	312,45

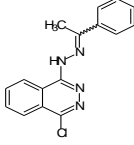
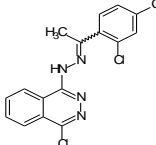
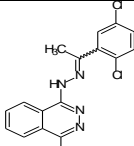
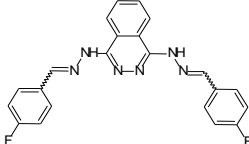
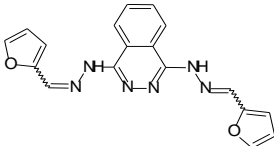
II5e		$C_{16}H_{13}N_4Cl$	296,45
II5f		$C_{16}H_{11}N_4Cl_2$	364,45
II5g		$C_{16}H_{11}N_4Cl_2$	364,45
II8b		$C_{22}H_{16}N_6F_2$	402,00
II8c		$C_{18}H_{14}N_6O_2$	346,00

Tabla 1. Derivados de Ftalacinas para la realización de pruebas biológicas anti-*Leishmania* spp. Sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal y Heterociclos, Departamento de Química, Universidad Simón Bolívar; a cargo del Dr. Simón E. López.

Metodologías

Cultivo celular de promastigotes de *Leishmania braziliensis*

Los promastigotes de *L. braziliensis* fueron aislados de lesiones generadas en ratones BALB/C previamente infectados. Una vez obtenida la muestra con los parásitos provenientes de la lesión y en condiciones de total esterilidad, se procedió a agregarlos en frascos de cultivo (T-25) que contenía medio de cultivo LIT Suero Fetal Bovino al 10% (inactivado), penicilina/estreptomicina (0,1 mg/mL). El cultivo se mantuvo a temperatura ambiente.

El medio LIT, es un medio de cultivo de parásitos que contiene todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de los mismos. Este medio contiene: una solución orgánica (triptosa 15 gr/L, extracto de levadura 5 gr/L y extracto de hígado 2 gr/L) y una solución inorgánica ($C_6H_{12}O_6$ 4 gr/L, NaCl 9 gr/L, KCl 0,4 gr/L y Na_2HPO_4 7,5 gr/L). (Camargo, 1964.)

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

Evaluación del efecto de compuestos derivados de Ftalacinas, sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

Con la finalidad de determinar de manera preliminar la actividad de los compuestos a evaluar, se procedió a realizar ensayos colorimétricos con sal de tetrazolium (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT). Se colocaron en una placa de 96 pozos, 200×10^3 promastigotes por pozo y se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas. Al transcurrir el tiempo previsto, se agregaron los 22 compuestos derivados de ftalacinas a evaluar, por triplicado, a una concentración única de $20 \mu\text{M}$ y se dejaron a temperatura ambiente por 96 horas. Transcurridas las 96 horas luego de agregados los compuestos a evaluar, se añadió MTT (1mg/ml) y se incubaron por 4 horas, en oscuridad. Finalmente las células fueron lisadas con isopropanol ácido y la placa leída en un lector de Elisa a 570 nm (Bompart y col., 2013).

En parásitos vivos, se encuentra metabólicamente activa la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que metaboliza la sal de tetrazolium (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) o MTT generando como producto cristales de formazán los cuales, luego de ser solubilizados, pueden ser detectados a 570 nm . Este tipo de reacciones colorimétricas, resultan muy útiles para realizar ensayos de viabilidad celular. La conversión solo se realiza en células vivas y la cantidad de formazán producido es proporcional al número de células presentes (Berridge y Tan, 1993; Mosmann, 1983).

Basados en las estimaciones con MTT los compuestos derivados de ftalacina seleccionados por su actividad leishmanicida fueron: **II4I, II4m y II8b**.

Cultivo de Macrófagos BMDM y determinación del efecto de compuestos seleccionados sobre la viabilidad de estos macrófagos.

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

Se sacrificaron ratones BALb/C por dislocación cervical, extirpándose seguidamente ambos pulmones. Los pulmones se colocaron en una capsula de Petri, lavándose tres (3) veces con solución PBS estéril. Se transfirieron luego a una cápsula de Petri con medio DMEM alto en glucosa y 20% de suero fetal bovino (SFB). El tejido se colocó en una solución de tripsina por 30 minutos a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido ese tiempo, se detuvo la reacción con suero fetal bovino para luego disgregar mecánicamente. La suspensión resultante se agregó en un T-25 y posteriormente se incubó a 37°C y 5% de CO₂ por 48h. Luego de transcurrido este lapso de tiempo se retiró el medio junto con los tejidos no adheridos, agregando medio DMEM alto en glucosa y 20% de SFB, incubando nuevamente a 37°C y 5% CO₂ por 7 días. Transcurridos este tiempo el medio fue colectado para su posterior utilización como medio condicionado L-929 para el cultivo de macrófagos BMDM (Núñez-Durán y col., 2012).

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

Inicialmente se diseccionó el fémur de ratones BALb/C sacrificados por dislocación cervical. Una vez obtenido, se colocó en una placa de Petri con medio DMEM glucosado y 20% de SFB. El material óseo se extrajo de la médula ósea de manera mecánica. Las células madres provenientes de la

médula, fueron cultivadas en un medio selectivo denominado BMDM, el cual está compuesto por: DMEM glucosado, 20% de SFB y 30% de sobrenadante de células L-929 (fibroblasto de ratón) como fuente de factor estimulante del crecimiento de macrófagos (Marim y col., 2010).

Los compuestos seleccionados por su actividad leishmanicida, fueron posteriormente evaluados en términos de su toxicidad sobre macrófagos BMDM, mediante la realización del ensayo colorimétrico MTT. Se colocaron, en una placa de 96 pozos, 20.000 macrófagos por pozo y se incubaron a 37°C por 24 horas. Pasadas las 24 horas se agregaron los compuestos a evaluar en concentraciones de 10, 50 y 100 μ M, por triplicado. Transcurridas 72 horas luego de agregados los compuestos, se añadió MTT (5mg/10ml), y se incubaron las placas por 4 horas, en oscuridad. Finalmente las células fueron lisadas con isopropanol ácido y la placa leída en un lector de Elisa a 570nm.

Basados en las estimaciones con MTT en términos de su toxicidad sobre la célula hospedera, los compuestos derivados de ftalacinas seleccionados para este trabajo especial de grado fueron: **II4I y II8b**. Seguidamente, estos compuestos fueron evaluados mediante la construcción de curvas de crecimiento parasitario in vitro.

Evaluación del efecto de compuestos derivados de ftalacinas, sobre la proliferación de promastigotes de *Leishmania braziliensis* mediante la construcción de curvas de crecimiento parasitario *in vitro*.

De acuerdo a los resultados obtenidos de los compuestos evaluados posterior a la realización del ensayo colorimétrico (MTT) en términos de su toxicidad sobre macrófagos BMDM los compuestos seleccionados **II4I y II8b** fueron evaluados mediante la construcción de curvas de crecimiento parasitario *in vitro*.

Las curvas de crecimiento y dosis respuesta de estos parásitos se realizaron en presencia y ausencia de II4I y 8IIb según lo reportado por Serrano-Martín y col. (2006), con modificaciones menores. Se agregaron 1×10^6 cel/mL en fiolas de cultivo con 10mL de medio LIT-Hemina, suplementado con SFB al 10% (inactivado), penicilina/estreptomicina (0.1 mg/mL). Transcurridas las 24 horas, se procedió a agregar las diferentes concentraciones de los compuestos de interés (II4I y II8b), disueltos en DMSO (0.1% final), incluyendo un control del experimento al cual no se le agrego compuesto alguno. Se realizaron 3 triplicados por condición en experimentos independientes. La proliferación celular se determinó diariamente, mediante contaje directo en cámara de Neubauer, hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo.

Con los datos obtenidos a las 72 horas de incubación (lo cual habitualmente representa la fase exponencial de crecimiento de los parásitos) se realizó una curva dosis-respuesta y fue posible graficar el título relativo de

los parásitos (respecto al control no tratado), contra las concentraciones de compuesto utilizadas.

Con la construcción de esta curva, se determinó la concentración efectiva de cada compuesto que inhibe la proliferación del 50% de la población de los parásitos en estudio (EC₅₀). Esta concentración de compuesto se obtuvo mediante el método de interpolación lineal propuesto por Huber y Koella (1993) y la siguiente fórmula matemática:

$$\text{Log (EC}_{50}\text{): Log (X}_1\text{)+ } \left\{ \frac{[(Y_1)-(Y_0/2)]}{Y_1-Y_2} [\text{Log (X}_2\text{)-Log (X}_1\text{)] } \right\}$$

Infección de macrófagos BMDM y determinación del efecto de compuestos seleccionados, sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*.

Se preparó una solución de macrófagos BMDM y promastigotes de *L. braziliensis*, en proporción 1:10. Posteriormente, se agregaron 80 µL de esta mezcla sobre vidrios cubre objeto, ubicados en el centro de placas de 24 pozos (Núñez-Durán y col., 2012). Para garantizar el proceso de infección y la fijación de los macrófagos a la superficie, se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo, se procedió a agregar a cada pozo las concentraciones de los compuestos II4I y II8b diluidos en 300µL de medio DMEM suplementado, incubándose por 96 horas en las mismas condiciones comentadas anteriormente. Para monitorear y contabilizar los macrófagos infectados y no infectados se utilizó la tinción Giemsa. (Brito y col., 2006).

Con los resultados obtenidos, se procedió a elaborar una curva dosis-respuesta que expreso: (a) porcentaje total de macrófagos, (b) porcentaje de macrófagos infectados y (c) número de amastigotes por macrófago; todos estos, respecto a concentraciones crecientes de los compuestos seleccionados.

Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa de *Leishmania braziliensis* en presencia y ausencia de ftalacinas

• Aislamiento y purificación parcial de la enzima superóxido dismutasa de *L. braziliensis*

- Lisis, obtención del homogenato y precipitación con sulfato de amonio

Para el aislamiento parcial de la superóxido dismutasa de *L. braziliensis* se utilizó el procedimiento descrito por Villagrán y col., (2005). Se partió de un cultivo de parásitos cultivados en medio LIT hasta su fase exponencial, los cuales fueron cosechados por centrifugación a 2.500xg y congelados a -80°C obteniendo un equivalente de 0,5-1gr de pellet. Este pellet se resuspendió en frío, en 3 ml de tampón 1 (0,25 M sacarosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA más inhibidores de proteasas). Posteriormente se realizó la lisis de los parásitos por homogenización en frío con un homogeneizador de vidrio/teflón aplicando entre 20 y 25 pulsos continuos. El homogenato resultante se sónico en frío aplicando tres ciclos, cada uno de 30 seg. con intervalos de reposo de 1min. siempre sobre hielo. De los 3ml obtenidos, 1ml del homogenato resultante se guardó para su posterior análisis, y los 2ml sobrantes fueron centrifugados a 1500 xg durante 10 min. a 4° C. El pellet resultante fue lavado 3 veces usando 3 ml por vez del tampón 1. Cada vez que se resuspendió el pellet se realizó una centrifugación en las mismas condiciones descritas

anteriormente. Al finalizar los tres lavados, se obtuvo un volumen final de 9ml y este se centrifugo a 2500 xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante resultante fue sometido a precipitación con sulfato de amonio sólido. El orden de incremento de saturación en porcentaje de sulfato de amonio fue de: 35,9 → 46,2 → 56,5 → 68,8 → 77 → 85 %. Las fracciones obtenidas por precipitación fueron resuspendidas en un volumen final no mayor a 3 ml de tampón 2 (150mM de Tris pH 8, 2mM EDTA). Esta fracción fue sometida a diálisis hasta alcanzar el equilibrio, a fin de eliminar el exceso de sales, para ello se utilizó una membrana de punto de corte equivalente a 15.000 Da, durante 72 horas con agitación continua y cambios del dializante (tampón 2) cada dos horas. La solución dializada se cuantificó utilizando ácido bicinonínico empleando albumina sérica bovina como proteína estándar (Smith y col., 1985).

- Purificación parcial de la enzima superóxido dismutasa de *L. braziliensis* por intercambio iónico en Q Sepharose™.

La fracción obtenida se cargó en una columna de Q Sepharose™ (10ml), previamente equilibrada en tampón 2, todo el procedimiento se realizó a 4° C. La columna fue lavada con tampón 2 hasta que la absorbancia a 280nm y 232nm llegó a 0. Las proteínas unidas a la resina fueron eluidas con un gradiente lineal de 0-2 M de NaCl en tampón 2 y a un flujo de 1 ml/min con recolección de fracciones cada 2 min. Se realizó el registro de absorbancias de cada fracción a 280nm y 232nm para determinar los picos de elusión. Los perfiles de proteínas en los picos eluidos fueron visualizados en geles de poliacrilamida SDS al 12% a fin de evaluar la heterogeneidad de los mismos luego de este primer paso cromatográfico.

- Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

La visualización del contenido proteico de las fracciones de interés y su complejidad se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en condiciones desnaturalizantes (Laemmli y col., 1970). Para ello se utilizaron minigeles de 1.5 mm de espesor conteniendo una mezcla de acrilamida/bis-acrilamida al 12%. Los geles obtenidos fueron revelados mediante una tinción con nitrato de plata (Rabilloud y col., 1988). En el caso de las electroforesis en condiciones no desnaturalizantes específicamente aplicable para los ensayos de actividad de la SOD en gel, se omitirá la utilización de β -mercaptoetanol y el calentamiento de las fracciones a evaluar, a fin de preservar la actividad enzimática.

• **Detección de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa de *L. braziliensis* en presencia y ausencia de II4I y II8b.**

El ensayo de actividad de la SOD de *L. braziliensis* se realizó siguiendo la metodología descrita por Beyer y Fridovich, (1987), modificado por La O y col., (2007). Brevemente, las fracciones provenientes del homogenato y las fracciones seleccionadas del proceso de purificación fueron corridas en geles de poliacrilamida (sin SDS) al 12% en condiciones no desnaturalizantes. Para todas las muestras se utilizaron 60 μ g de proteínas totales y las condiciones de corrida fueron: 3 horas a 80 y 120 V a una temperatura de 4°C. Para la evaluación del efecto de las ftalacinas seleccionadas se incubaron las muestras previamente, durante 3 horas a 29°C y 5% de CO₂, a las concentraciones señaladas a continuación. Se realizaron dos geles, en uno se corrieron fracciones provenientes del homogenato a concentraciones crecientes de los

compuestos II4I (3,4; 170; 340; 3400 μ M) y II8b (0,12; 6; 12; 120 μ M), incluyendo un control positivo al cual no se le agrego compuesto alguno, y un control negativo con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) el cual es el inhibidor clásico reportado para la SODFe de tripanosomatidos (Carrasco, 2007). En el segundo gel se corrieron las fracciones seleccionadas del proceso de purificación y aquellas con mayores picos de absorbancia fueron evaluadas frente a concentraciones de los compuestos II4I (3,4 μ M) y II8b (0,12 μ M) para determinar su actividad. Posteriormente los geles fueron incubados durante 30 minutos, en oscuridad, en presencia del compuesto azul de Nitro-Tetrazolio (NBT) a una concentración de 2,45mM. Seguidamente se procedió a realizar una inmersión de los geles en una solución de Ribofalvina a 28mM a pH 7,8, durante 15 minutos con agitación constante. Esto se realizó en un transiluminador de luz visible y agregando 56 μ l de TEMED por cada 25ml de solución a fin de evitar la oxidación de la riboflavina. El revelado de la actividad SOD en el gel se llevó acabo de acuerdo con el método descrito por Beauchamp y Fridovich (1971), basado en la reducción colorimétrica del NBT en presencia de luz, lo cual generó un precipitado marron violáceo (formazan) uniforme en todo el gel. Las bandas de actividad SOD aparecieron como zonas acromáticas en dicho fondo, debido a la no reducción del NBT como consecuencia de la presencia y actividad de la SOD, quien actuó catalizando la remoción de los iones superóxido libres, impidiendo la generación del formazan.

RESULTADOS

Evaluación del efecto de derivados de ftalacinas sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, mediante MTT.

Poblaciones de promastigotes de *L. braziliensis* fueron expuestas a una concentración única de 20 μ M de cada derivado de ftalacina, con la finalidad de evaluar su actividad antiparasitaria, mediante MTT. Los compuestos II4c, II4l, II4m y II8b mostraron ser efectivos inhibiendo en más del 50% la proliferación de dichos parásitos en cultivo con respecto al control sin tratamiento (Figura11). Dada la importante actividad antiproliferativa demostrada por los últimos tres compuestos, fueron seleccionados para evaluarlos en términos de su toxicidad sobre macrófagos BMDM.

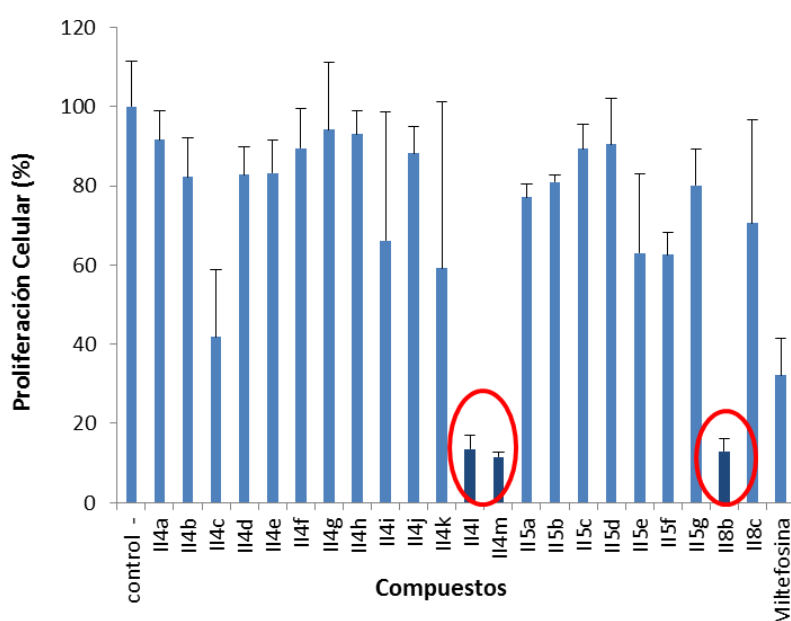


Figura 10. Derivados de ftalacinas evaluados sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*, mediante MTT. Los compuestos seleccionados fueron II4l, II4m y II8b por poseer una alta actividad antiparasitaria inhibiendo en más de un 80% la viabilidad de estos parásitos.

Determinación del efecto de los compuestos seleccionados sobre la viabilidad de macrófagos BMDM

Seguidamente, los compuestos II4I, II4m y II8b seleccionados fueron evaluados sobre macrófagos BMDM (en concentraciones de 10, 50 y 100 μ M), con la finalidad de comprobar la inocuidad de los mismos sobre la célula hospedera. De los tres compuestos evaluados solamente II4I y II8b (figura resultaron inocuos a concentraciones de 10 μ M (80% proliferación celular), y presentando efecto citotóxico a concentraciones \leq 50 μ M (menos del 50% de proliferación celular) (Figura 12). El compuesto II4m presentó valores altos de citotoxicidad con valores por debajo del 40% en la menor concentración evaluada. Este resultado nos permitió determinar que los derivados II4I y II8b a concentraciones de 10 μ M resultaron más efectivos sobre el parásito, que sobre su célula hospedera (macrófagos BMDM). Por lo anteriormente expuesto fueron seleccionados para las siguientes fases de experimentación.

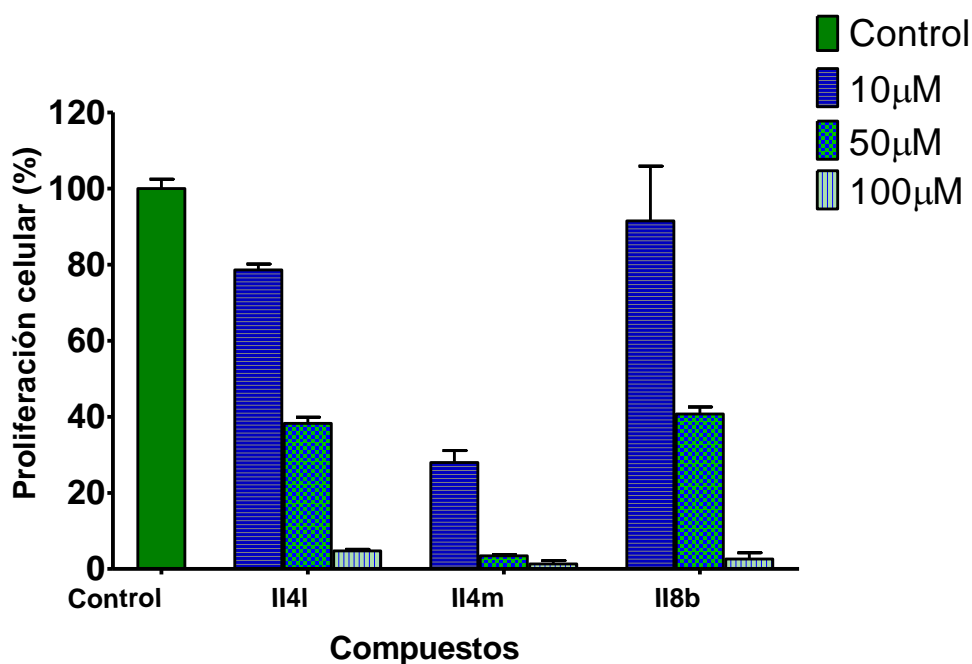


Figura 11. Actividad citotóxica de los compuestos derivados de ftalacinas, sobre la viabilidad de macrófagos BMDM mediante MTT.

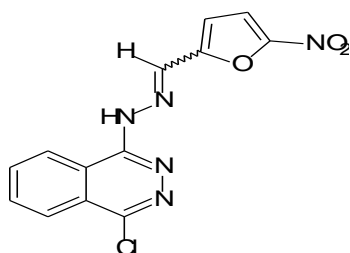
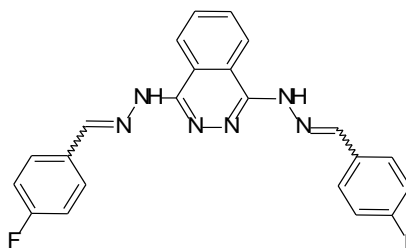
A**B**

Figura 12. A-) Estructura del derivado de ftalacina II4I (derivados de 1-(2-bencilidenehidracinil)-4-Cloroftalacina). **B-)** Estructura del derivado de Ftalacina II8b (derivados de 1,4-bis((E)-2-bencilidenehidracinil)ftalacina). Sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal y Heterociclos, Departamento de Química, Universidad Simón Bolívar; a cargo del Dr. Simón E. López.

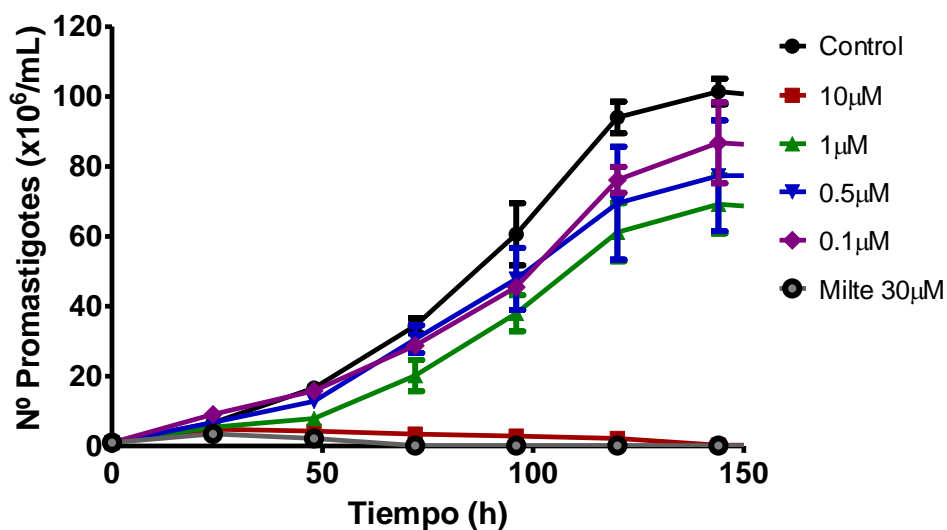
Evaluación del efecto de los derivados II4I y II8b sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*, curvas de crecimiento.

Poblaciones de promastigotes de esta especie de parásitos fueron expuestos a diversas concentraciones de II4I y II8b determinándose su proliferación diaria por 7 días, a través de contaje directo con cámara de Neubauer. Los resultados muestran un efecto dosis dependiente a concentraciones crecientes del derivado II4I (Figura 13-A). Con los datos de contaje a las 72h de cultivo (fase exponencial), se construyó una curva dosis respuesta (Figura 13-B). Determinando que II4I fue capaz de inhibir el 50% de la proliferación de promastigotes en cultivo con un valor de EC_{50} de $3,4 \mu\text{M}$.

Del mismo modo se puede observar en la Figura 14-A un efecto dosis dependiente a concentraciones crecientes del derivado II8b. Con los datos de contaje a las 72h de cultivo (fase exponencial), se procedió a construir una curva dosis respuesta para este derivado (Figura 14-B), determinando un valor de EC_{50} de $0,12 \mu\text{M}$, resultando este último más efectivo en este estadio

parasitario que el derivado II4I. Los valores de referencia de Miltefosina se incluyen en todos los casos para comparación.

A



B

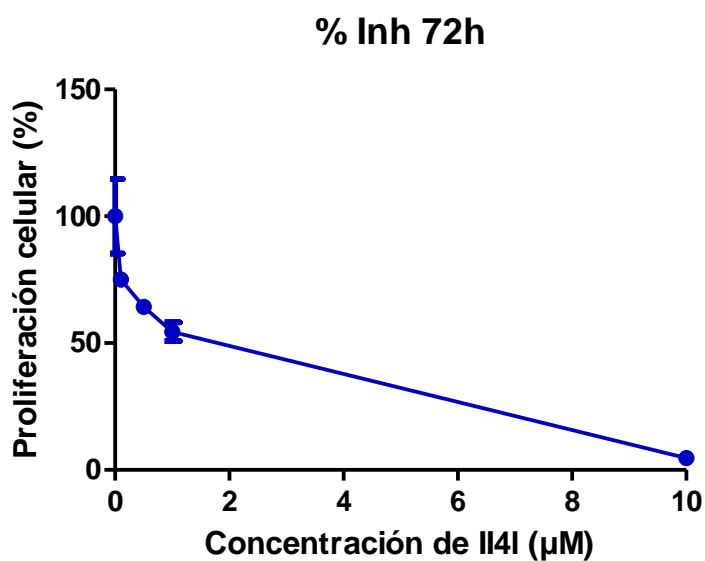
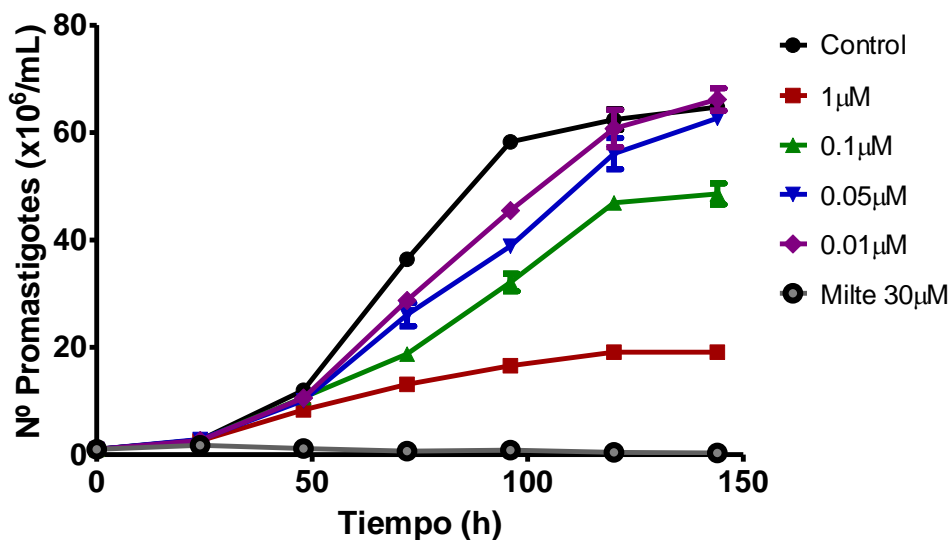


Figura 13. Efecto del derivado de ftalacina II4I sobre la proliferación de promastigotes de *L. braziliensis*.

A-) Curva de proliferación celular de promastigotes de *L. braziliensis*. Se puede observar la evolución en el tiempo de poblaciones de parásitos a concentraciones crecientes del compuesto II4I. A medida que aumenta la concentración del compuesto disminuye la proliferación celular. **B-)** Curva dosis respuesta del compuesto II4I sobre promastigotes de *L. braziliensis*. Se puede observar el efecto del compuesto, sobre

la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*. Este compuesto, genera un potente efecto dosis dependiente sobre la viabilidad de estos parásitos, mostrando un valor de EC₅₀: 3,4μM.

A



B

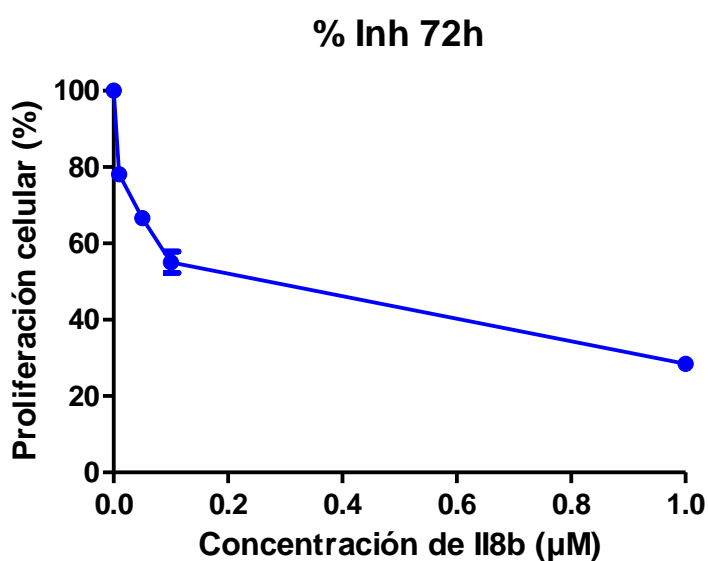


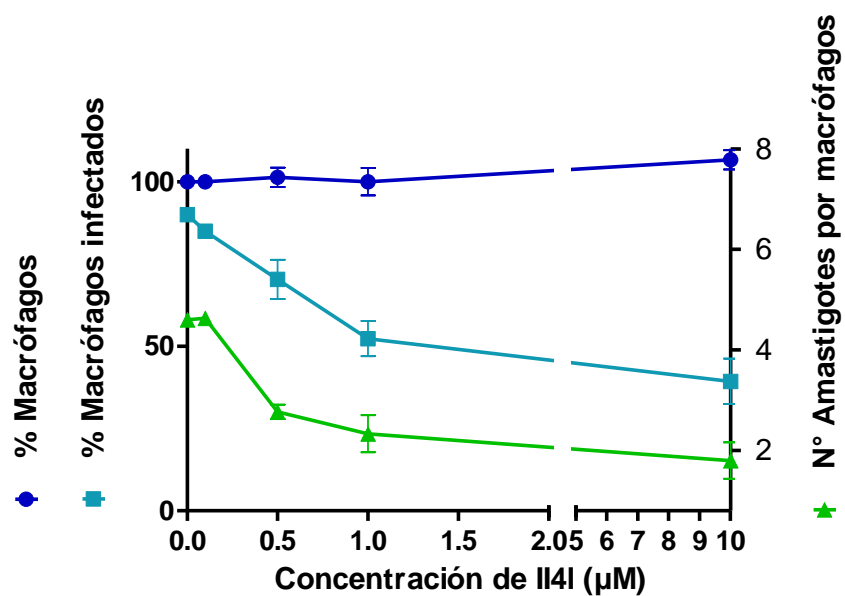
Figura 14. Efecto del derivado de ftalacina II8b sobre la proliferación de promastigotes de *L. braziliensis* **A-**) Curva de proliferación celular de promastigotes de *L. braziliensis*. Se puede observar la evolución en el tiempo de poblaciones de parásitos a concentraciones crecientes del compuesto II8b. A medida que aumenta la concentración del compuesto disminuye la proliferación celular. **B-**) Curva dosis respuesta del compuesto II8b sobre promastigotes del *L. braziliensis*. Se puede observar el efecto del

compuesto, sobre la viabilidad de promastigotes de *L. braziliensis*. Este compuesto, genera un efecto dosis dependiente sobre la viabilidad de estos parásitos, mostrando un valor de EC₅₀: 0.12 μM.

Determinación del efecto de II8b y II4I sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis*

Con la finalidad de determinar el efecto de estos compuesto sobre el estadio quimioterapéuticamente importante de la leishmaniasis (amastigote intracelular), se procedió a infectar macrófagos BMDM con promastigotes de *L. braziliensis* en una proporción de 10 promastigotes por cada macrófago en cultivo, evaluándose el efecto de diversas concentraciones de II4I y II8b sobre: a) porcentaje de macrófagos infectados y b) número de amastigotes por macrófago. Con la construcción de una curva dosis-respuesta, fue posible observar la existencia de un efecto dosis-dependiente sobre el porcentaje de macrófagos infectados y sobre la cantidad de amastigotes por macrófago. La concentración efectiva capaz de inhibir el 50% de la proliferación de amastigotes en cultivo (EC₅₀) para II4I fue de 0,12μM, y la concentración efectiva capaz de inhibir el 50% de los macrófagos infectados para este mismo derivado fue de 0,54μM (Figura 15-A). De la misma manera observamos para el derivado II8b la concentración efectiva capaz de inhibir el 50% de la proliferación de amastigotes en cultivo (EC₅₀) la cual fue de 0,59μM, y la concentración efectiva capaz de inhibir el 50% de los macrófagos infectados que tuvo un valor de 1,42μM (Figura 15-B). Observamos que los derivados II4I y II8b no afectan la viabilidad de los macrófagos en cultivo, siendo el efecto netamente sobre los amastigotes intracelulares.

A



B

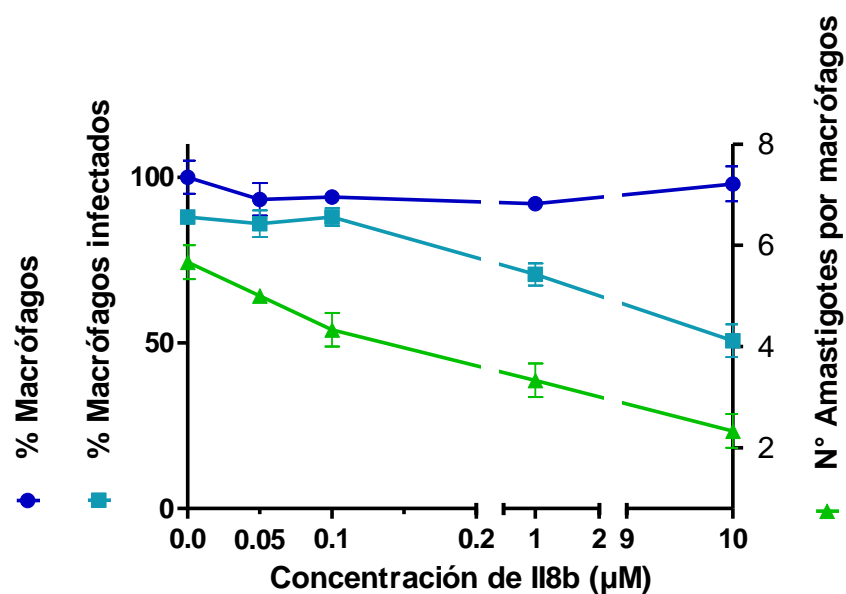


Figura 15. Efecto de derivados de ftalacinas sobre amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* **A-)** Curva dosis-respuesta del derivado de ftalacina I14I sobre la proliferación de amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*. Macrófagos BMDM infectados con amastigotes de *L. braziliensis* en una proporción 1:10. **B-)** Curva dosis-respuesta del derivado de ftalacina I18b sobre la proliferación de amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*. Macrófagos BMDM infectados con amastigotes de *L. braziliensis* en una proporción

1:10.

Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa de *Leishmania braziliensis* en presencia y ausencia de ftalacinas

Se realizó la purificación parcial de la SOD utilizando la metodología de Beyer y Fridovich, (1987), modificado por La O y col., (2007), por lo que en la Figura 16 se muestra el perfil de elución de la columna de intercambio iónico Q sepharose™. Con este registro fue posible elegir aquellas fracciones visualizadas en el gel de poliacrilamida en condiciones disociantes, para determinar la eficiencia parcial de la purificación. Las fracciones elegidas fueron: 1, 2, 3, 4, 6, 8, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 y 50.

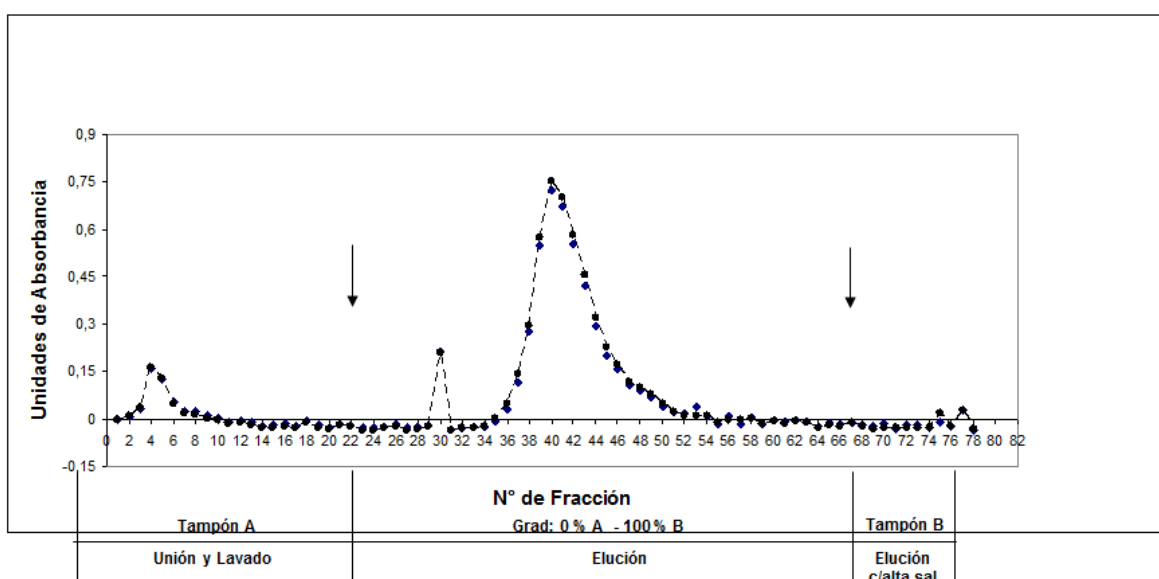


Figura 16. Perfil de elución de las fracciones provenientes de la cromatografía en Q Sepharose™ de *L. braziliensis*. Las flechas indican el inicio y el final de la elución de las proteínas unidas, aplicando un gradiente lineal continuo de NaCl desde 0-2M.

La separación electroforética en condiciones disociantes nos permitió la visualización del contenido proteico y la complejidad de las fracciones de

interés (Figura 17). En las fracciones 36, 38, 40, 42, 44 y 46 fue posible observar una banda pronunciada la cual se encontraba entre los pesos molecular de 50 y 75kD, la cual nos indica la presencia de una proteína en mayor concentración y otra banda menos pronunciada que se encontraba entre los pesos molecular de 25 y 37kD en las mismas fracciones (Figura 17). Por esta razón, para el ensayo de actividad fueron elegidas las fracciones 38,40,42 que representan los mayores pico de elución obtenidos, además de las fracciones 3, 17 y 21, para comprobar que las fracciones eluidas que no se adhirieron a la columna no presentaban actividad de la SOD.

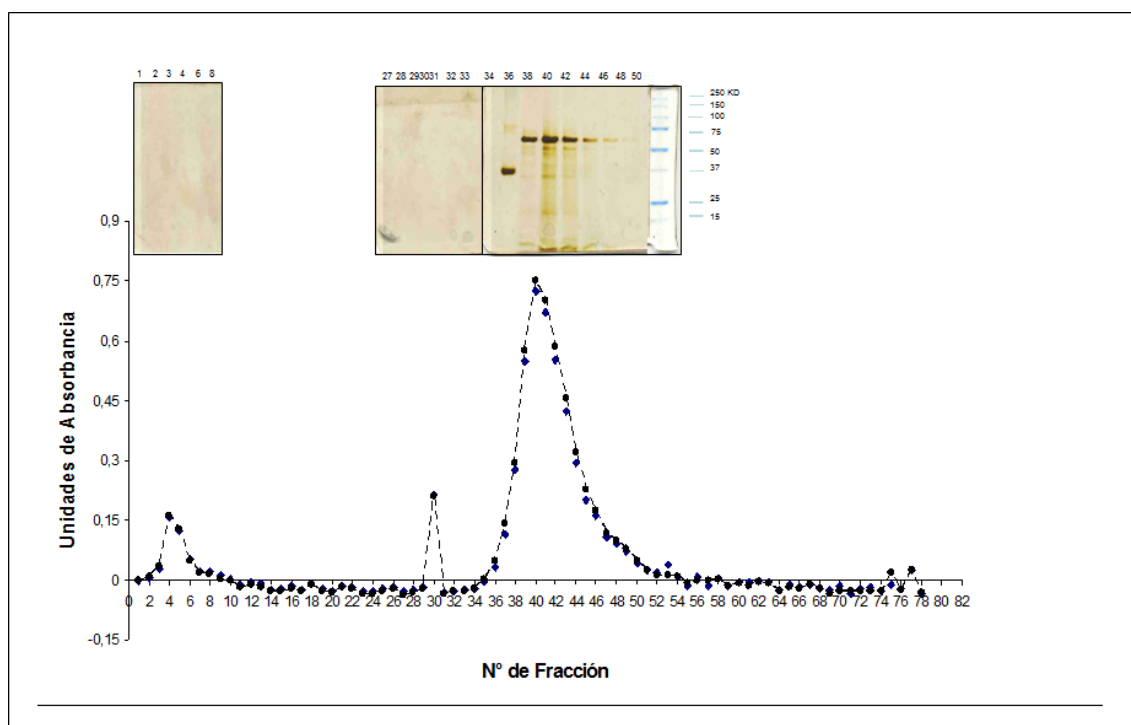


Figura 17. Comparación del perfil de elución con los gels obtenidos de acuerdo a las fracciones evaluadas las cuales coinciden con el mayor pico de absorbancia observado en el perfil de elución.

La separación electroforética en condiciones nativas permitió la detección de la enzima superóxido dismutasa de *L. braziliensis* tanto para las fracciones provenientes del homogenato (Figura 18) como para las fracciones

provenientes de la purificación parcial (Figura 19), la SOD se observó como zonas acromáticas en el fondo de los geles debido a la no reducción del NBT como consecuencia de la presencia y actividad de la misma. En los carriles donde fueron agregados los compuestos a evaluar, tanto para las fracciones provenientes del homogenato como para las fracciones provenientes de la purificación, no se observó inhibición de la enzima SOD a las concentraciones evaluadas. En las fracciones 3, 17 y 21 las cuales corresponden a las fracciones que no se adhirieron a la columna no se observó actividad de SOD. En cuanto a el ensayo de inhibición, se realizó un control negativo con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) inhibidor clásico reportado para la FeSOD de tripanosomatidos (Carrasco, 2007). Como muestra la Figura 18 y 19, en los carriles donde fue agregado el peróxido de hidrogeno se evidencio una inhibición total de SOD siendo este comportamiento característico de las isoformas ligadas a hierro.

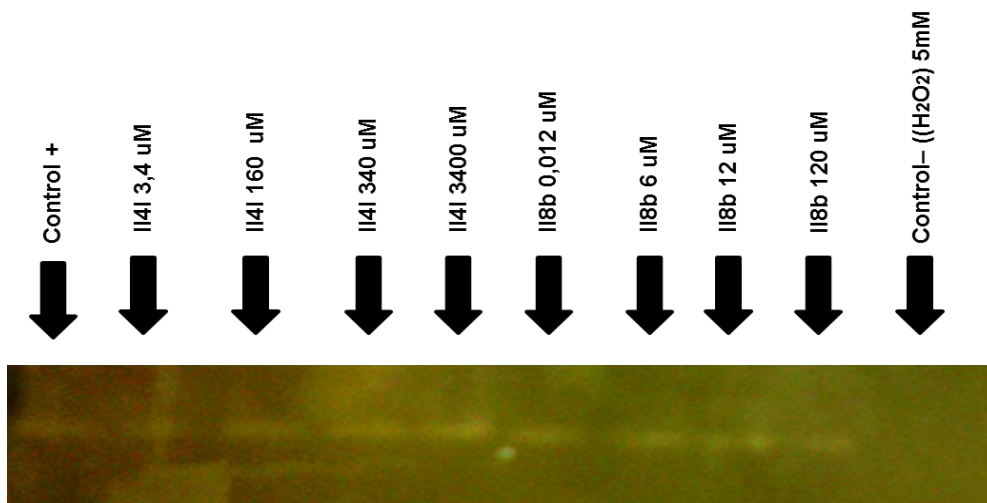


Figura 18. Revelado según la técnica de Beauchamp y Fridovich (1971) de la actividad de la enzima SOD para las fracciones provenientes del homogenato.

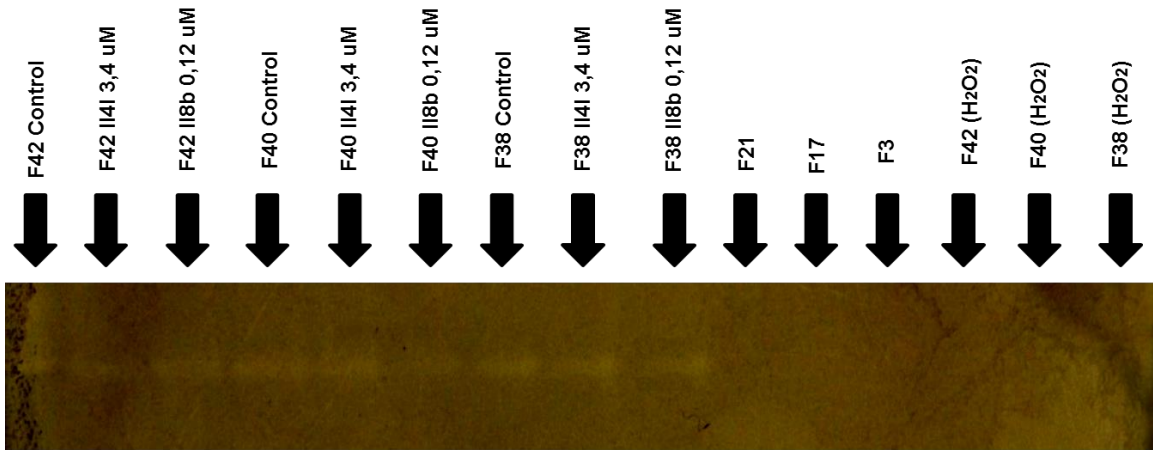


Figura 19. Revelado según la técnica de Beauchamp y Fridovich (1971) de la actividad de la enzima SOD para las fracciones provenientes de la purificación.

DISCUSIÓN

La Leishmaniasis es una de las enfermedades más importantes transmitida por vectores. Según la OMS, cada año se diagnostican 1.3 millones de casos nuevos de leishmaniasis en el mundo, por lo que esta enfermedad parasitaria constituye un importante problema de salud pública (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>). A pesar de los esfuerzos realizados durante los últimos años en el campo de la quimioterapia contra la leishmaniasis las drogas que se utilizan actualmente para el tratamiento de esta enfermedad, Glucantime y el Pentostan (antimoniales pentavalentes), han resultado ser realmente insuficientes (Vélez y col., 2012; Sánchez-Moreno y col., 2012). En la actualidad solo hay una droga alternativa para su tratamiento, la Miltefosina, este alquil-lisofosfolípido activo por vía oral es el mayor avance que se ha hecho contra esta parasitosis, sin embargo su teratogenicidad y desarrollo de resistencia ha limitado ampliamente su uso en regiones endémicas (Serrano-Martin, 2010; Núñez-Durán y col., 2012). En este sentido resulta urgente el desarrollo de nuevos fármacos más eficaces menos costoso y menos tóxicos en la lucha contra esta enfermedad.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de 22 derivados de ftalacina sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* y su célula hospedera (macrófagos BMDM). Estudiamos además si el posible mecanismo de acción de aquellos compuestos con actividad antiparasitaria resultaba de la inhibición de la actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa, enzima clave para la sobrevivencia de estos parásitos.

Primeramente se evaluó el efecto de los 22 derivados de ftalacinas sobre la viabilidad de promastigotes *L. braziliensis*. Mediante evaluaciones con MTT se determinó que de los 22 derivados los compuestos II4 c, II4m, II4I y II8b mostraron ser efectivos inhibiendo en más del 50% la proliferación de los parásitos en cultivo con respecto al control (Figura 11), sin embargo, los últimos tres disminuyeron la proliferación por debajo del 20% por lo que fueron estos los compuestos escogidos para continuar el estudio. Seguidamente, éstos compuestos fueron evaluados sobre la viabilidad de macrófagos BMDM con la finalidad de comprobar la inocuidad de los mismos sobre la célula hospedera. De los tres compuestos evaluados solamente II4I y II8b resultaron inocuos a concentraciones $\geq 10\mu\text{M}$ sobre la célula hospedera por lo cual fueron seleccionados para las siguientes fases de experimentación (Figura 11). El grado de toxicidad de cada uno de los compuestos seleccionados es crucial, ya que se buscan compuestos con altos porcentajes de inhibición a dosis poco tóxicas para las células del hospedador.

Mediante la construcción de curvas de crecimiento fue posible determinar que los derivados de ftalacinas II4I y II8b generaron un potente efecto dosis-dependiente sobre la proliferación de promastigotes de *L. braziliensis*, mostrando un valor de EC_{50} : $3,4\mu\text{M}$ para II4I y un valor de EC_{50} : $0,12\mu\text{M}$ aprox. para II8b (Figura 12 y 13). Este comportamiento resultó similar a los reportados en 2007 por Sánchez-Moreno y col. los cuales diseñaron y sintetizaron una serie de derivados de 1,4-bis(alquilaminas)benzo[g]ftalazinas que presentaron actividad anti-

Trypanosoma cruzi. Posteriormente, este mismo grupo en 2012, estudió la potencial actividad *in vitro* de imidazol o pirazol a base de benzo[g]ftalazina contra *Leishmania infantum* y de *Leishmania braziliensis*, reflejando valores de EC_{50} para estos compuestos de 18 a $10\mu\text{M}$. Como se puede observar los valores reportados de EC_{50} sobre promastigotes de *L. braziliensis* obtenidos en este trabajo de investigación se encuentran hasta dos y tres veces por debajo de los reportados por Sánchez-Moreno y col., (2012). Este resultado apuntaría a que los derivados de ftalacinas II4I y II8b (Figura 19), parecen ser más efectivos en esta especie de parásitos que los imidazol o pirazol a base de benzo[g]ftalazina.

Posteriormente se determinó mediante la realización de una curva dosis-respuesta que los compuestos II4I y II8b afectaron la viabilidad de amastigotes intracelulares de esta especie de parásitos, el cual, es el estadio clínicamente importante de la leishmaniasis. En este sentido, determinamos que los compuestos II4I y II8b afectaron la viabilidad de amastigotes intracelulares de manera dosis-dependiente sin afectar la viabilidad de la célula hospedera (macrófagos BMDM) (Figura 14), corroborando los resultados obtenidos en la primera fase de selección de nuestros compuestos. La concentración efectiva que se obtuvo capaz de inhibir el 50% de la proliferación de amastigotes en cultivo (EC_{50}) para II4I fue de $0,12\mu\text{M}$ aprox., y la concentración efectiva capaz de inhibir el 50% de los macrófagos infectados para este mismo derivado fue de $0,54\mu\text{M}$ aprox. (Figura 14-A). La concentración efectiva capaz de inhibir el 50% de la proliferación de amastigotes en cultivo (EC_{50}) para II8b fue de $0,59\mu\text{M}$ aprox., y la

concentración efectiva capaz de inhibir el 50% de los macrófagos infectados para este mismo derivado fue de 1,42 μ M aprox. (Figura 14-B). Podemos decir, entonces, que probablemente estos dos derivados de ftalacina son más efectivos en el estadio intracelular que en el estadio extracelular, sin embargo, los valores de EC₅₀ calculados son aproximados ya que no se alcanzó el 100% de inhibición de la proliferación de amastigotes en cultivo.

Con respecto a la drogas de primera línea para el tratamiento de esta parasitosis, el Glucantime, se han reportado valores de EC₅₀ de 25 a 30 μ M (Sánchez-Moreno y col., 2012), mientras que para la Miltefosina estos valores fueron estimados en el laboratorio alrededor de 20 μ M dependiendo de la cepa de *L. braziliensis*. Para el caso de los derivados de ftalacina utilizados en este estudio muestran una actividad antiparasitaria significativamente mayor con un EC₅₀ hasta 10 veces menor que los de referencia de estas drogas. Este resultado resulta relevante al momento de que el compuesto sea utilizado como tratamiento ya que a menores concentraciones necesarias para lograr la inhibición de la viabilidad del parásito, menos tóxico, invasivo y dañino será el mismo.

Se ha demostrado que ciertos derivados de ftalacinas presentan una actividad antichagásica relacionada con la inhibición de la actividad de la SOD (Sanz y col., 2008; Sánchez-Moreno y col., 2011). También Sánchez-Moreno y col., (2012), demostraron que los mismos derivados presentan actividad leishmanicida basados en la inhibición de la SOD presente en estos parásitos. Se cree que esta actividad se debe a la capacidad que tiene este tipo de

derivados para interactuar con el Fe y formar complejos estables que dejan a la enzima sin este centro metálico fundamental para el proceso de eliminación de los superóxido (Romero, 2013).

Los derivados utilizados en este trabajo están basados precisamente en ftalacinas funcionalizada con arilo y heteroarilo mediante puente de hidrazona y fueron diseñados basados en el farmacóforo clave del blanco terapéuticos de la enzima superóxido dismutasa (Romero, 2013). Teniendo en cuenta este blanco terapéutico se planteó que el mecanismo de acción de estos dos compuestos II4I y II8b está basado en la actividad anti-SOD para la cual fueron diseñados.

Bajo esta premisa, en el presente estudio determinamos la actividad enzimática de la superóxido dismutasa de *L. braziliensis* en presencia y ausencia de los derivados II4I y II8b. Mediante la metodología empleada no logramos observar inhibición de la SOD por acción de nuestros derivados ni en la fracción purificada ni en el homogenato de parásitos (Figura 17 y 18). Este resultado nos permite inferir que el potente efecto lesihmanicida puede no ser a través de la inhibición directa de la enzima SOD. Sin embargo, se plantea la necesidad de corroborar este resultado con otras metodologías descritas como las planteadas por Sánchez-Moreno y col, (2012). El otro mecanismo de acción reportado para las ftalacinas se refiere a su posible acción sobre el catabolismo de la glucosa de estos parásitos (Sánchez-Moreno y col., 2012), sin embargo, esta hipótesis no fue objeto de estudio en este trabajo pero abre la posibilidad de explicar el potente efecto antiparasitario observado. Sería interesante entonces, plantearse otros ensayos para determinar cuál es el mecanismos de

acción de estos derivados los cuales han demostrado poseer un potente efecto sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes de *L. braziliensis*.

Lo interesante de esta nueva metodología, propuesta para evaluar la actividad y posible inhibición de la SOD en tripanosomatidios, fue haber podido observar un comportamiento típico de isoformas ligadas a hierro, al ser inhibidas por el peróxido de hidrogeno. Estos parásitos comparten esta característica con otras SOD estudiadas con anterioridad en otros kinetoplastidos patógenos, como *T. brucei* (Kabiri y Steverding, 2001; Wilkinson y col., 2006), *T. cruzi*. (Sánchez-Moreno y col., 2012) o *Phytomonas spp.* (Marin y col., 2004). Este resultado nos afirma que la metodología empleada fue capaz de evaluar inhibición, por lo menos del inhibidor clásico.

En conclusión, el presente trabajo nos permitió demostrar que tanto II4I como II8b afectan la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*. Sin embargo, no podemos afirmar con certeza la interacción específica de los compuestos con la SOD, y su consecuente inhibición. Haría falta una aproximación metodológica distinta que corrobore estos resultados.

Resalta de este estudio, la relevancia de estudiar este tipo de derivados como posibles alternativas terapéuticas para esta enfermedad, dado el potente efecto que se puede observar en los modelos “in vitro” estudiados.

CONCLUSIONES

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

- 1.- El derivado de ftalacina II4I afectó la proliferación de promastigotes de *L. braziliensis* con un EC_{50} : 3,4 μ M.
- 2.- El derivado de ftalacina II8b afectó la proliferación de promastigotes de *L. braziliensis* con un EC_{50} : 0,12 μ M aprox.
- 3.- El derivado de ftalacina II4I afectó la proliferación de amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* de manera dosis-dependiente, sin afectar la viabilidad de la célula hospedera (macrófagos BMDM) a un valor de EC_{50} = 0,12 μ M aprox.
- 4.- El derivado de ftalacina II8b afectó la proliferación de amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* de manera dosis-dependiente, sin afectar la viabilidad de la célula hospedera (macrófagos BMDM) a un valor de EC_{50} = 0,59 μ M aprox.
- 5.- Se diseñó e implementó un método sencillo para la determinación de la actividad de la SOD de promastigotes de *L. braziliensis*. Este método nos permitió determinar que la enzima es inhibida por H_2O_2 , su inhibidor clásico, sin embargo, no fue inhibida por ninguno de los derivados ensayados.

BIBLIOGRAFÍA

- Beauchamp C., Fridovich I. 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical biochemistry*. **44**: 276-287
- Becerril M. 2008. *Parasitología Médica*. Editorial MacGraw Hill/ Interamericana, Segunda edición, México D. F., México.
- Benaim G., Garcia C. 2012. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis -a review. *Bol. Mal. Salud. Amb.* **52**:1690-4648.
- Berridge M., Tan A. 1993. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archiv. of Biochem. and Bioph.* **303**: 474-82.
- Beyer W., Fridovich I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem.* **161(2)**:559-66.
- Bompard D., Núñez-Durán J., Rodríguez D., Kouznetsov V., Meléndez C., Sojo F., Arvelo F., Visbal G., Alvarez A., Serrano-Martín X., García-Marchán Y. 2012. Anti-leishmanial evaluation of C2-aryl quinolines: Mechanistic insight on bioenergetics and sterol biosynthetic pathway of *Leishmania braziliensis*. *Bioorg. Med. Chem.* **21**: 4426–4431.
- Boutaleb S. 2010. Efecto Biológico de Nuevos Compuestos de Síntesis y Naturales Frente a Tripanosomatideos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada, España.
- Botero D., Restrepo M. 2012. *Parasitosis Humana*. Editorial CIB, Quinta edición, Medellín, Colombia.
- Brito S., Crescente O., Fernández A., Coronado A. and Rodríguez N. 2006. Eficacia del ácido kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asteracea) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Biomédica*. **26**:180-87.
- Camargo E. 1964. Growth and differentiation in *trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. **6**:93-100.
- Canese A., Domingo J., Oddone R., Viveros C., Ruiz P., Roa L., Fernández J. 2011. Manual diagnóstico y tratamiento de las leishmaniasis en Paraguay. Disponible en: <http://www.senepa.gov.py>. [Consulta 10/08/14].

- Carrasco H. 2007. Estudio de la Superoxido Dismutasa en *Trypanosoma cruzi*: purificación, caracterización bioquímica y aplicaciones diagnósticas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada, España.
- Castilla J. 1994. Quimioterapia Experimental con Moléculas de nuevas síntesis, frente a la Leishmaniosis Visceral y la Enfermedad de Chagas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada, España.
- Castilla J., Mesa-Valle C., Sanchez-Moreno M, Arnedo T., Rosales M., Mascaro C., Craciunescu D., Osuna A. 1996. In vitro activity and biochemical effectiveness of new organometallic complexes of osmium (III) against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*. *Arznein Forsch* **46**: 990-996.
- Carter N., Berger B., Fairlamb A. 1995. Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei brucei*. *J. Biol. Chem.* **270**: 28153-28157.
- Carter N., Fairlamb A., 1993. Arsenical-resistant trypanosomes lack an unusual adenosine transporter. *Nature.* **361**: 173- 176.
- Chang Yong Hong. 2001. Discovery of gemifloxacin (Factive, LB20304a): a quinolone of new a generation. *Farmaco Il.* **56**: 41–44.
- Dang Z., Yang Y., Ji R., Zhang S. **2007**. Synthesis and antibacterial activity of novel fluoroquinolones containing substituted piperidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**:4523-4526.
- De Lima H., Borges R., Escobar J., and Convit J. 2011. Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela, bienio 2008-2009. *Bol. Mal. Salud Amb.* **LI**: 215-24.
- Desjeux P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Microbiol. Infect. Dis.* **27**: 305-18.
- Dougherty T., Beaulieu D., Barrett J. 2001. New quinolones and the impact on resistance. *Drug. Discov. Today.* **6**:529-536.
- Dufernez F., Yernaux C., Gerbod D., Noël C., Chauvenet M., Wintjens R., Edgcomb V., Capron M., Opperdoes F., Viscogliosi E. 2006. The Presence of FourIron-Containing Superoxide Dismutase Isozymes in Trypanosomatidae: Characterization, Subcellular Localization and Phylogenetic Origin in *Trypanosoma brucei*. *Free Radical Biology and Medicine.* **40 (2)**: 210-225.
- Echenique H., Moral M., Hidalgo S., Orduna T., Riarte A., Ruvisnky S., Salomón D. 2010. Enfermedades infecciosas: Leishmaniasis visceral. Guía para el equipo de salud Nro5. ISSN 1852-1819. Dirección de Epidemiología - Ministerio de Salud de la Nación. Cdad. Autónoma de Bs. As., República Argentina. Disponible en: www.msal.gov. [Consulta: 29/08/14].

- Fernández-Ramos C., Entrala E., Rosales M., Navarro I., Romero M., Salas-Peregrin I., Sánchez-Moreno M. 2000. Activities of Pt(II) and Ru(III) Triazole-Pyrimidine Complexes against *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei*. *Comp. Biochem. Phys.* **C.126**: 39-44.
- Garcia P. 2012. Identificación de inhibidores de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD–CuZn) del parásito *Taenia solium* mediante simulación del acoplamiento molecular proteína-ligando (docking). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Iztapalapa. México D.F., México.
- Garcia-Almagro D. 2005. Leishmaniasis cutánea. *Actas Dermosifiliogr.* **96(1)**:01-24.
- Genetu A., Gadisa E., Aseva A., Barr S., Lakew M., Jirata D., Kuru T., Hunegnaw M., Gedamu L. 2006. *Leishmania aethiopia*: Strain Identification and Characterization of Superoxide Dismutase-B genes. *Experimental Parasitology.* **113 (4)**: 221- 226.
- Huber W., Koella J. 1993. A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drugs resistance in malaria parasites. *Acta Trop.* **55**:257-61.
- Jimenez B., Stewart M., Yardley V., Brun R., Barrett M., **Gilbert I.** 2005. Design and Synthesis of a Series of Melamine-based nitroheterocycles with activity against Trypanosomatid Parasites. *J. Med. Chem.* **48**: 5570-5579.
- Kabiri M., Steverding D. 2001 Identification of a Developmentally Regulated Iron Superoxide Dismutase of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biochemistry.* **360**: 173- 177.
- La O. M., Arencibia A., López R., Acevedo R., Leon O., Rodríguez E. 2007. Proteínas relacionadas con la defensa en la interacción *Sporisorium scitamineum*- caña de azúcar. *Agronomía Mesoamérica.* **18(2)**:197-203.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227(5259)**:680-5.
- Luque F., Fernández-Ramos C., Entrala E., Rosales M., Marín C., Salas J., Navarro J., Sánchez-Moreno M. 2000. Biochemical and ultrastructural alterations caused by newly synthesized 1, 2, 4-triazole [1,5a] pyrimidine derivatives against *Phytomonas staheli* (Trypanosomatidae). *Toxicol In Vitro.* **14**:487-495.
- Marin, C.; Rodriguez. I.; Hitos, A.; Rosales, M. J.; Dollet, M. y Sanchez-Moreno, M. 2004. Purification and Characterization of Two Iron Superoxide Dismutases of *Phytomonas* sp. Isolated from *Euphorbia characias* (Plant Trypanosomatids). *Parasitology.* **129**: 79-86.

- Marim, F., Silveira T., Lima D., and Zamboni D. 2010. A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. *Plos One*. **5(12)**: 15263-15268.
- Montalvo A., Fraga J., Monzote L., García M., Fonseca L. 2012. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. Departamento de Parasitología. *Revista cubana de medicina tropical*. **64(2)**:108-131.
- Morales M. 2002. Epidemiología molecular de la coinfección por “*Leishmania*”-VIH. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. Mosmann T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63.
- Mosmann T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. **65**: 55-63.
- Núñez-Durán J., Bompert D., Charris J., Camacho J. 2012. Efectos deletéreos del Jc25 sobre la bioenergética celular y la biosíntesis de esteroides de *Leishmania braziliensis*. *Revista Facultad de Farmacia*. **75**: 50-58.
- OMS (2007). 60ª Asamblea Mundial de la Salud. Control de la leishmaniasis. Informe de la Secretaria; Resolución N° A60/10; Ginebra, Suiza. Disponible en: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHASSA_WHA60-Rec1/S/WHASS1_WHA60REC1-sp.pdf. [Consulta: 20/03/15].
- Oletta J., Carvajal A., Peña S. 2011. Leishmaniasis Consideraciones generales y epidemiológicas, Red de sociedades Científicas Médicas Venezolanas Comisión de Epidemiología Alerta Epidemiológica No 195. Disponible en: http://www.rscmv.org.ve/pdf/alerta_195.pdf. [Consulta: 29/08/14].
- Padrón M., Díaz E., Romero A., Machuca C., Ponte A. 2007. Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimio-resistencia. *VITAE*. N. 33. 01-22. Disponible en: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=39&m=2&n=1165&e=1214>. [Consulta: 14/08/14].
- Paramchuk, W., Ismail S., Bhatia A., Gedamu L. 1997. Cloning, Characterization and Overexpression of Two Iron Superoxide Dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: Role in Pathogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **90**: 203- 221.
- Pereira A., Pérez M. 2002. Leishmaniosis. *OFFARM*. 21:116-124. Disponible en: <http://www.dfarmacia.com>. [Consulta 08/08/2014].

- Rabilloud T., Carpentier G., Tarroux P. 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis*. **9(6)**:288-291.
- Ramírez M. 2012. Búsqueda de nuevos fármacos de actividad antiparasitaria frente a *Leishmania spp.* y *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Granada, España.
- Rodríguez-Ciria M., Sanz A., Yunta M., Gómez-Contreras F., Navarro P., Sanchez-Moreno M., Boutaleb-Charki S., Osuna A., Castiñeiras A., Pardo M., Canoa C., Campayo L. 2007. 1,4-Bis(alkylamino)benzo[g]phthalazines able to form dinuclear complexes of Cu(II) which as free ligands behave as SOD inhibitors and show efficient in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem.* **15**:2081–2091.
- Romero A. 2013. Síntesis de compuestos heterocíclicos funcionalizados derivados de 4-aminoquinolinas, benzo[b]naftiridonas y ftalacinas con potencial actividad biológica. Tesis Doctoral. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- Salomón O. 2009. Vectores de leishmaniasis en las Américas. *Gaz. méd. Bahia*. **79**:3-15.
- Sánchez-Moreno M., Sanz A., Gómez-Contreras F., Navarro P., Marín C., Ramirez-Macias I., Rosales M., Olmo F., Garcia-Aranda I., Campayo L., Cano C., Arrebola F., Yunta M. 2011. In Vivo Trypanosomicidal Activity of Imidazole- or Pyrazole-Based Benzo[g]phthalazine Derivatives against Acute and Chronic Phases of Chagas Disease. *J. Med. Chem.*, **54**, 970–979.
- Sánchez-Moreno M., Gómez-Contreras F., Navarro P., Marín C., Ramirez-Macias I., Rosales M., Olmo F., Sanz A., Campayo L., Cano C., Yunta M. 2012. In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* species. *J Antimicrob Chemother.* **67**: 387–397.
- Sanz A., Gómez-Contreras F., Navarro P., Sánchez-Moreno M., Boutaleb-Charki S. Campuzano J., Pardo M., Osuna A., Cano C., Yunta M., Campayo L. 2008. Efficient Inhibition of Iron Superoxide Dismutase and of *Trypanosoma cruzi* Growth by Benzo[g]phthalazine Derivatives Functionalized with One or Two Imidazole Rings. *Med. Chem.* **51**, 1962–1966.
- Sies H. 1985. Oxidative Stress: Introductory Remarks. *Oxidative Stress* (Ed. Sies, H.), Academic Press (Orlando): 1- 8
- Smith P., Krohn R., Hermanson G., Mallia A., Gartner F., Provenzano M., Fujimoto E., Goeke N., Olson, B., Klenk D. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.

- Serrano-Martin X., Payares G. and Mendoza-León A. 2006. Glibenclamide. A blocker of K⁺ ATP channels shows anti-leishmanial activity in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**:72-76.
- Serrano-Martin X., Payares G., Lucca M., Martinez J., Mendoza-León A., Benaim G. 2009. Amiodarone and Miltefosina act synergistically against *Leishmania mexicana* and can Induce Parasitological Cure in a murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:5108-13.
- Serrano-Martin X. 2010. Quimioterapia contra la Leishmaniasis: estado del arte, retos y nuevas propuestas desde Venezuela. *Revista de Estudios Transdisciplinarios (rET)* **2(1)**: 69-76.
- Smith P., Krohn R., Hermanson G., Mallia A., Gartner F., Provenzano M., Fujimoto E., Goetze N., Olson, B., Klenk D. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- Villagrán M., Marín C., Rodríguez-González I., De diego J., Sánchez-Moreno M. 2005. Use of an iron superoxide dismutase excreted by *Trypanosoma cruzi* in the diagnosis of chagas disease: seroprevalence in rura Zones of the state of Queretaro, Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73(3)**:510–516.
- Vélez I., Jiménez A., Le Cacheux C., Vásquez D., López L. 2012. Terapéutica de las Leishmaniasis Americanas. Nuevas recomendaciones. *Dermatol Venez.* **50**:15-28.
- Walker, J., Murry J., Soheili A., Ceglia S., Springfield S., Bazaral C., Dormer P., Hughes D. 2005. Practical application of new catalytic methods: a concise synthesis of a potent PDE IV inhibitor. *Tetrahedron.* **61**: 6330–6336.
- Wilkinson S., Prathalingam R., Taylor M., Ahmed A., Horn D., Kelly J. M. 2006. Functional Characterization of the Iron Superoxide Dismutase Gene Repertoire in *Trypanosoma brucei*. *Free Radical Biology and Medicine.* **40**: 198 – 209.
- Yépez J., Scorza J. 2003. Quimioterapia de la leishmaniasis cutánea localizada. *Bol. Mal. Salud Amb.* **XLIII**: 9-20.

Vínculos:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>

<http://cienciacebas.wordpress.com/2013/01/>

<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.