



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA Y CITOTÓXICA DE 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles) FRENTE A *Leishmania mexicana*

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

Dr. Jorge Humberto Heredia Moya

Autora

Shirley Lissete Licto Iler

Año

2016

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido ese trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante(s), orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

---

Jorge Humberto Heredia Moya

Doctor en Química

171085583-2

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes. “

---

Shirley Lissete Licto Iler

172388375-5

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a mis padres por su amor y apoyo incondicional. Al Dr. Jorge Heredia y a todos los miembros del CIT por su amistad, enseñanza y confianza brindada. Y a la Universidad de las Américas, profesores y compañeros por todo el conocimiento transmitido

## DEDICATORIA

A mis padres Freddy y Mary,  
mi hermano Javier, mi  
sobrinito Jampier y toda mi  
familia.

## RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por parásitos protozoarios del género *Leishmania* y se manifiesta de tres formas clínicas: cutánea, mucocutánea y visceral. En el Ecuador se ha reportado solamente la forma cutánea producida por siete especies de *Leishmania* entre las cuales se encuentra *L. mexicana*. En la actualidad, el tratamiento disponible para la leishmaniasis se basa en el uso de compuestos pentavalentes de antimonio los cuales producen efectos secundarios graves, y además generan resistencia en los parásitos. En la presente investigación se evaluó la actividad leishmanicida y citotóxica de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles) frente a *Leishmania mexicana* y macrófagos RAW 264.7 mediante el método del MTT. Los datos obtenidos en esta investigación muestran que todos los pirazol-5-oles evaluados presentan efecto leishmanicida, siendo los de mejor actividad **C8** y **C12** con un IC<sub>50</sub> de 33,35 µM para **C8** y 89,37µM para **C12** trascurridas 24h de incubación, y presentan un CC<sub>50</sub> de 101,4µM y 144,1 µM respectivamente luego de 48h de tratamiento. Mediante citometría de flujo utilizando el fluoróforo DiBAC<sub>4</sub>(3) se observó que **C8**, a una concentración de 150 µM afecta el potencial de membrana del parásito, mientras que **C12** no lo hace, incluso a una concentración de 300 µM. Se realizó un análisis de la relación estructura-actividad de los compuestos activos y se pudo ver la importancia de la presencia del grupo nitro en el anillo.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* and is manifested in three clinical forms: cutaneous, mucocutaneous and visceral. In Ecuador, only the cutaneous form produced by seven species of *Leishmania*, among which *L. mexicana*, has been reported. Currently available therapy for leishmaniasis is based on the use of pentavalent antimony compounds that produce serious side effects and also generate resistance in parasites. In this research the leishmanicidal and cytotoxic activity was evaluated of 4,4'- (arilmetilen) -bis- (1-phenyl-3-methyl-1*H*-pyrazol-5-ols) against *L. mexicana* and RAW 264.7 macrophages by the MTT method. The data obtained in this research show that all pyrazol-5-oles evaluated present leishmanicidal effect, the best activity was of **C8** and **C12** with an  $IC_{50}$  of 33.35  $\mu$ M for **C8** and 89,37 $\mu$ M for **C12** after 24h of incubation, and they present a  $CC_{50}$  of 101,4 $\mu$ M for **C8** and 144.1  $\mu$ M for **C12** after 48h of treatment. By flow cytometry using the fluorophore DiBAC<sub>4</sub> (3) was observed that **C8** at a concentration of 150  $\mu$ M affects membrane potential parasite, while **C12** does not affect even at a concentration of 300  $\mu$ M. An analysis of the structure-activity relationship of the active compounds was performed and the importance of the presence of the nitro group in the ring was observed.

# ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema .....	3
1.3. Justificación del Problema.....	3
1.4. Hipótesis .....	4
1.5. Objetivos.....	4
1.5.1. Objetivo general.....	4
1.5.2. Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	6
2.1. Generalidades de la Leishmaniasis .....	6
2.2. Agente Causal.....	9
2.2.1. Clasificación Taxonómica .....	10
2.2.2. Ciclo biológico.....	11
2.3. Manifestaciones Clínicas .....	14
2.3.1. Leishmaniasis Cutánea .....	14
2.3.2. Leishmaniasis Visceral .....	16
2.3.3. Leishmaniasis Mucocutánea .....	18
2.4. Diagnóstico .....	18
2.4.1. Diagnóstico en Leishmaniasis Visceral.....	19
2.4.2. Diagnóstico en Leishmaniasis Cutánea.....	21
2.4.3. Diagnóstico en Leishmaniasis Mucocutánea .....	21
2.5. Tratamiento.....	22
2.6. 4,4'-(Arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1 <i>H</i> -pirazol-5-oles)...	24
2.6.1. Propiedades .....	25
2.6.2. Síntesis de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1- fenil-3-metil-1 <i>H</i> - pirazol-5-oles .....	26
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA .....	27
3.1. Esquema de la experimentación.....	27

3.2.	Síntesis de los compuestos químicos.....	28
3.3.	Cultivo in vitro de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	29
3.4.	Ensayo in vitro de la actividad leishmanicida de los pirazoles en promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	29
3.5.	Determinación de la concentración inhibitoria media (IC <sub>50</sub> ) de los compuestos bioactivos en promastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	30
3.6.	Cultivo in vitro de macrófagos RAW 264.7 .....	31
3.7.	Ensayo in vitro de la citotoxicidad de los pirazoles en macrófagos RAW 264.7 .....	31
3.8.	Determinación de la concentración citotóxica media (CC <sub>50</sub> ) de los compuestos bioactivos en macrófagos RAW 264.7 .....	32
3.9.	Análisis del daño de potencial de membrana en promastigotes mediante citometría de flujo.....	32
3.10.	Análisis de estadístico.....	33
	<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
4.1.	Efecto leishmanicida de los pirazoles en cultivos in vitro de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	344
4.2.	Determinación de la IC <sub>50</sub> de los compuestos bioactivos frente a promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	38
4.3.	Efecto citotóxico de los pirazoles en cultivos in vitro de macrófagos RAW 264.7 .....	40

4.4. Determinación de la $CC_{50}$ de los compuestos bioactivos frente a macrófagos RAW 264.7 .....	41
4.5. Análisis del cambio de potencial de membrana en promastigotes <i>Leishmania mexicana</i> . .....	44
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....	47
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES.....	48
REFERENCIAS .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Casos endémicos de Leishmaniasis en el Ecuador.....	8
<i>Figura 2.</i> Estructura morfológica de <i>Leishmania</i> .....	10
<i>Figura 3.</i> Clasificación taxonómica del género <i>Leishmania</i> . ....	11
<i>Figura 4.</i> Ciclo biológico de la <i>Leishmania</i> . ....	12
<i>Figura 5.</i> Desarrollo de diferentes formas de promastigotes en la mosca hembra. ....	13
<i>Figura 6.</i> Vectores del género <i>Leishmania</i> .....	14
<i>Figura 7.</i> Lesiones de leishmaniasis cutánea localizada. ....	15
<i>Figura 8.</i> Lesiones de leishmaniasis cutánea difusa. ....	16
<i>Figura 9.</i> Leishmaniasis visceral, esplenomegalia en un paciente etíope..	17
<i>Figura 10.</i> Leishmaniasis mucocutánea .....	18
<i>Figura 11.</i> Estructuras de derivados de fenil pirazolonas .....	25
<i>Figura 12.</i> Estructura de pirazolonas .....	25
<i>Figura 13.</i> Síntesis de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1- fenil-3-metil-1 <i>H</i> -pirazol-5-oles) .....	26
<i>Figura 14.</i> Diagrama de bloques de la evaluación de la actividad leishmanicida y citotóxica de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1 <i>H</i> -pirazol-5-oles) frente a <i>Leishmania mexicana</i> .....	27
<i>Figura 15.</i> Procedimiento general para la síntesis de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1 <i>H</i> -pirazol-5-oles).....	28
<i>Figura 16.</i> Actividad leishmanicida de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1 <i>H</i> -pirazol-5-oles) frente a promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	35
<i>Figura 17.</i> Estructura de los pirazol-5-oles. ....	36
<i>Figura 18.</i> Determinación de la concentración inhibitoria media (IC <sub>50</sub> ) de C8 frente a promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	39
<i>Figura 19.</i> Determinación de la concentración inhibitoria media (IC <sub>50</sub> ) de C12 frente a promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> .....	39
<i>Figura 20.</i> Actividad citotóxica de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1 <i>H</i> -pirazol-5-oles) a 300µM frente a macrófagos RAW 264.7 a las 48h.	40

<i>Figura 21.</i> Determinación de la concentración citotóxica media (CC <sub>50</sub> ) de C8 frente a macrófagos RAW 264.7 .....	42
<i>Figura 22.</i> Determinación de la concentración citotóxica media (CC <sub>50</sub> ) de C12 frente a macrófagos RAW 264.7.....	42
<i>Figura 23.</i> Efecto de C8 en el potencial de membrana de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> después de 24h.....	45
<i>Figura 24.</i> Efecto de C12 en el potencial de membrana de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> después de 24h.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución geográfica de las diferentes especies de <i>Leishmania</i> .	7
Tabla 2. Casos de leishmaniasis reportados en el Ecuador durante la primera semana de enero del 2016.....	9
Tabla 3. Terapias utilizadas según la geografía de la infección y la especie de <i>Leishmania</i> .....	22
Tabla 4. Medicamentos utilizados en el tratamiento de la Leishmaniasis. .	23
Tabla 5. Concentración de los compuestos bioactivos.....	30
Tabla 6. Tiempo-Respuesta de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1 <i>H</i> -pirazol-5-oles) C1–C12 frente a promastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	34
Tabla 7. Análisis estadístico de la actividad leishmanicida de C1-C12 a diferentes tiempos mediante la prueba de ANOVA.....	37
Tabla 8. Análisis de Tukey de las medias de los compuestos C1-C12 obtenidas en promastigotes de <i>L. mexicana</i> .....	37
Tabla 9. Porcentaje de viabilidad de C8 y C12 a distintas concentraciones. ....	38

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

Las infecciones producidas por parásitos son causantes de una gran mortalidad y morbilidad, principalmente en regiones tropicales y subtropicales, siendo la toxoplasmosis, la malaria, la tripanosomiasis y la leishmaniasis las principales enfermedades de este tipo, las cuales afectan especialmente a países en vías de desarrollo y aproximadamente al 25% de la población mundial (Alvar *et al.*, 2012, pp. 1-9). La leishmaniasis pertenece a un grupo de infecciones tropicales producidas por diferentes parásitos del género *Leishmania*, y se encuentra presente en 98 países con un total aproximado de 220 000 casos reportados de leishmaniasis cutánea, y 58 000 casos para la leishmaniasis visceral (Alvar *et al.*, 2012, pp. 2- 8).

Se han identificado más de 20 especies de *Leishmania* como patógenos para el ser humano las cuales producen tres variantes de esta enfermedad, leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2015). En el Ecuador se ha reportado solamente la forma cutánea, y se encuentra presente en zonas no urbanas de la costa, sierra y oriente (Ministerio de Salud Pública [MSP], 2013, p. 104). Según la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, en el país hay un total de 1401 casos reportados, de los cuales 332 pertenecen a la Provincia de Pichincha, siendo el mayor número de casos hasta la primera semana de Enero del 2016 (MSP, 2016, p. 13).

En la actualidad, el tratamiento de esta infección se basa en el uso de drogas administradas principalmente por vía parenteral, las cuales son costosas y presentan ciertas desventajas de las cuales podemos mencionar; su alta toxicidad, generación de efectos adversos severos, inconsistencia en su efectividad, y a esto se suma que en los últimos años se ha observado resistencia de los parásitos frente a los tratamientos usados

(Boelaert y Sundar, 2014, p. 646). Los medicamentos más utilizados para el tratamiento de esta enfermedad son compuestos pentavalentes de antimonio, (Pentostam, Glucantime®) (Mohapatra, 2014, pp. 4-9), pero debido a la resistencia del parásito frente a estos compuestos se utilizan también fármacos de segunda línea como Pentamidina, Anfotericina B, Miltefocina, Ambisome, Fluconazol y Paromomicina principalmente (Croft y Olliaro, 2011, p. 14).

Debido a la limitada disponibilidad de medicamentos efectivos en contra de la leishmaniasis, las investigaciones se han centrado en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad leishmanicida, las cuales pueden ser obtenidas a partir de productos naturales o por vía sintética, siendo esta última la vía por la cual se obtienen los principios activos de la gran mayoría de los medicamentos, y en los cuales es común encontrar por lo menos una estructura heterocíclica (Gomtsyan, 2012, pp. 7-9).

Los pirazoles y sus derivados son heterociclos importantes que están presentes en muchos compuestos bioactivos y presentan, por ejemplo, propiedades antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias. Además, derivados de 2,4-dihidro-3*H*-pirazol-3-ona, incluyendo 4,4'-(arilmetileno)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles), tienen un amplio espectro de actividades biológicas reportadas y han sido usados como agentes antiinflamatorios, antipiréticos, estimulantes de secreciones gástricas, antidepresivos, antibacteriales y antifilarias. Asimismo, estos pirazol-5-oles se han usado como fungicidas, pesticidas, insecticidas, y colorantes (Niknam y Mirzaee, 2011, pp. 2403–2413). Sin embargo, a pesar de la gran variedad de actividades reportadas para estos heterociclos, no existen estudios sobre la actividad leishmanicida de compuestos que incorporen estos núcleos en su estructura. De los pocos compuestos similares estudiados, los derivados de fenil pirazolonas, pese a no mostrar una buena actividad leishmanicida (Gehrke, 2012, pp. 190-199), son interesantes porque son intermediarios en la síntesis de 4,4'-(arilmetileno)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles). Además, considerando que la estructura central de estos pirazol-5-oles es semejante a la que presentan

varias 3,3'-(arilmetilen)-bis-(2-hidroxinaftalen-1,4-dionas), las cuales presentan una potente actividad leishmanicida (Sharma, Chowdhury, Sinha, Majumder y Kumar, 2014, pp. 185-189), el estudio de estos 1*H*-pirazol-5-oles frente a estos parásitos toma interés. Debido a esto, y a su importancia, en el presente trabajo se realizará el estudio de la actividad citotóxica y leishmanicida frente a *L. mexicana* de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles).

## 1.2. Planteamiento del problema

La leishmaniasis es una parasitosis que se encuentra principalmente en países subdesarrollados, y afecta a poblaciones de escasos recursos, debido a esto, no está entre las prioridades de las industrias farmacéuticas el desarrollo de nuevos programas de investigación con el fin de obtener nuevas drogas que sean capaces de contrarrestar esta infección. A pesar de los avances en la investigación para la obtención de nuevos fármacos, esta no se ha logrado combatir eficientemente (Mohapatra, 2014, pp. 4-9). Por otra parte, existe una limitada disponibilidad de medicamentos seguros y efectivos para el tratamiento de esta enfermedad, lo que ha ocasionado que la mayoría de la población endémica dependa de la medicina tradicional para aliviar sus síntomas (Weigel *et al.*, 1994, pp. 400–413), sin embargo, varios de los tratamientos utilizados para la leishmaniasis cutánea por ejemplo, son corrosivos y/o tóxicos y producen un empeoramiento de las lesiones sin llegar a tener un efecto real sobre los parásitos (Boelaert y Sundar, 2014, p. 646).

## 1.3. Justificación del Problema

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria que está determinada como un problema de salud a nivel mundial. En la actualidad, el Ecuador ha reportado siete especies responsables de esta enfermedad entre las cuales se encuentra principalmente la *Leishmania mexicana* (Bañuls *et al.*, 1999, p. 838). Según los datos de la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica,

en el Ecuador la única forma de presentación es la leishmaniasis cutánea con una amplia distribución, especialmente en las zonas rurales de las regiones costa, sierra y Amazonía (MSP, 2013). A esto se suma que los tratamientos disponibles para esta infección ocasionan efectos secundarios graves en los pacientes y generan resistencia de los parásitos, lo que hace necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos que sean seguros y eficaces (Croft y Olliaro, 2011, pp. 1478–1481), por lo tanto, en el presente proyecto se plantea realizar la evaluación de la citotoxicidad y la actividad leishmanicida, frente a *L. mexicana*, de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles) los cuales se espera que presenten actividad leishmanicida debido a la presencia de un núcleo de pirazolona en su estructura.

#### **1.4. Hipótesis**

Los 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles) presentan actividad leishmanicida frente a *Leishmania mexicana*.

#### **1.5. Objetivos**

##### **1.5.1. Objetivo general**

Evaluar la citotoxicidad y la actividad leishmanicida de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles) frente a *Leishmania mexicana*.

##### **1.5.2. Objetivos específicos**

- Determinar la actividad leishmanicida de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles) frente a *L. mexicana*.
- Calcular la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) de los compuestos que sean activos frente a *L. mexicana*
- Evaluar la actividad citotóxica de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles) sobre macrófagos RAW 264.7

- Calcular la concentración citotóxica media ( $CC_{50}$ ) de los compuestos que sean activos frente a macrófagos RAW 264.7
- Determinar el mecanismo de acción de los compuestos bioactivos mediante citometría de flujo.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Generalidades de la Leishmaniasis

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por parásitos del género *Leishmania*, transmitida por la picadura de moscas hembra del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Dawit, Girma y Simenew, 2013, p. 41). Según reportes de la Organización Mundial de la Salud, esta enfermedad se encuentra presente en 98 países causando un estimado de 20000 y 30000 muertes por año, poniendo en riesgo alrededor de 350 millones de personas, lo que representa un problema de salud a nivel mundial (OMS, 2015). Es importante mencionar que la leishmaniasis está relacionada con factores como la pobreza y la desnutrición, por lo que afecta principalmente a países en vías de desarrollo en los cuales existen altos índices de morbilidad (OMS, 2015). Lo anterior mencionado, sumado a la poca atención que la enfermedad recibe, hace que la leishmaniasis se encuentre en el grupo de “*enfermedades tropicales desatendidas*” (OMS, 2015).

Se han identificado más de 20 especies de *Leishmania* como patógenos para el ser humano, las cuales son responsables de manifestar tres formas clínicas diferentes:

La leishmaniasis cutánea es la forma más común y menos letal, en ésta se observa úlceras sobre la piel dejando cicatrices deformantes en la cara, brazos y piernas (OMS, 2015).

La leishmaniasis mucocutánea se caracteriza por presentar úlceras eritematosas que producen una destrucción parcial o completa de las membranas de la nariz, boca y garganta causando un proceso inflamatorio con destrucción y perforación (Von Stebut, 2015, p. 195).

La leishmaniasis visceral conocida también como kala azar es la forma más letal, afecta a los órganos internos como el hígado y el bazo (Salam, Al-Shaqha y Azzi, 2014, p. 1), se caracteriza por eventos irregulares de fiebre, pérdida de

peso, hepatoesplenomegalia y anemia (Reveiz, Maia-Elkhoury, Nicholls, Sierra y Yadon, 2013, pp. 1-2).

Cada especie de *Leishmania* tiene una ubicación geográfica específica y causa diferentes formas clínicas de la parasitosis, lo cual permite clasificarlas como causantes de la enfermedad en el Viejo Mundo y el Nuevo mundo como se muestra en la Tabla 1 (Von Stebut, 2015, p. 194).

Tabla 1. Distribución geográfica de las diferentes especies de *Leishmania*.

Distribución Geográfica	Especies	Forma clínica
Viejo Mundo (Asia, África, Mediterráneo)	<i>L. major</i>	Leishmaniasis cutánea
	<i>L. aethiopica</i>	
	<i>L. tropica</i>	
Nuevo Mundo (Centro y Sur América)	<i>L. mexicana</i>	
	<i>L. amazonensis</i>	
	<i>L. panamensis</i>	
	<i>L. peruviana</i>	
	<i>L. braziliensis</i>	
	<i>L. guyanensis</i>	
Nuevo Mundo (Sur América)	<i>L. braziliensis</i>	
	<i>L. panamensis</i>	
	<i>L. guyanensis</i>	
	<i>L. amazonensis</i>	
Viejo Mundo (Asia, África, Mediterráneo)	<i>L. infantum</i>	Leishmaniasis visceral
	<i>L. donovani</i>	
Nuevo Mundo (Sur América)	<i>L. chagasi</i>	
Viejo Mundo (Asia)	<i>L. tropica</i>	Leishmaniasis visceral
Nuevo Mundo (Sur América)	<i>L. amazonensis</i>	
	<i>L. braziliensis</i>	

Tomado de Von Stebut, 2015, p. 195.

En el Ecuador existe solamente la forma clínica cutánea y se encuentra distribuida en zonas no urbanas de la costa sierra y oriente (MSP, 2013). Según la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, en el país hay un total de 1401 casos, de los cuales 332 pertenecen a la Provincia de Pichincha, siendo el mayor número de casos reportados hasta la primera semana de Enero del 2016 (Figura 1) (MSP, 2016, p. 13).

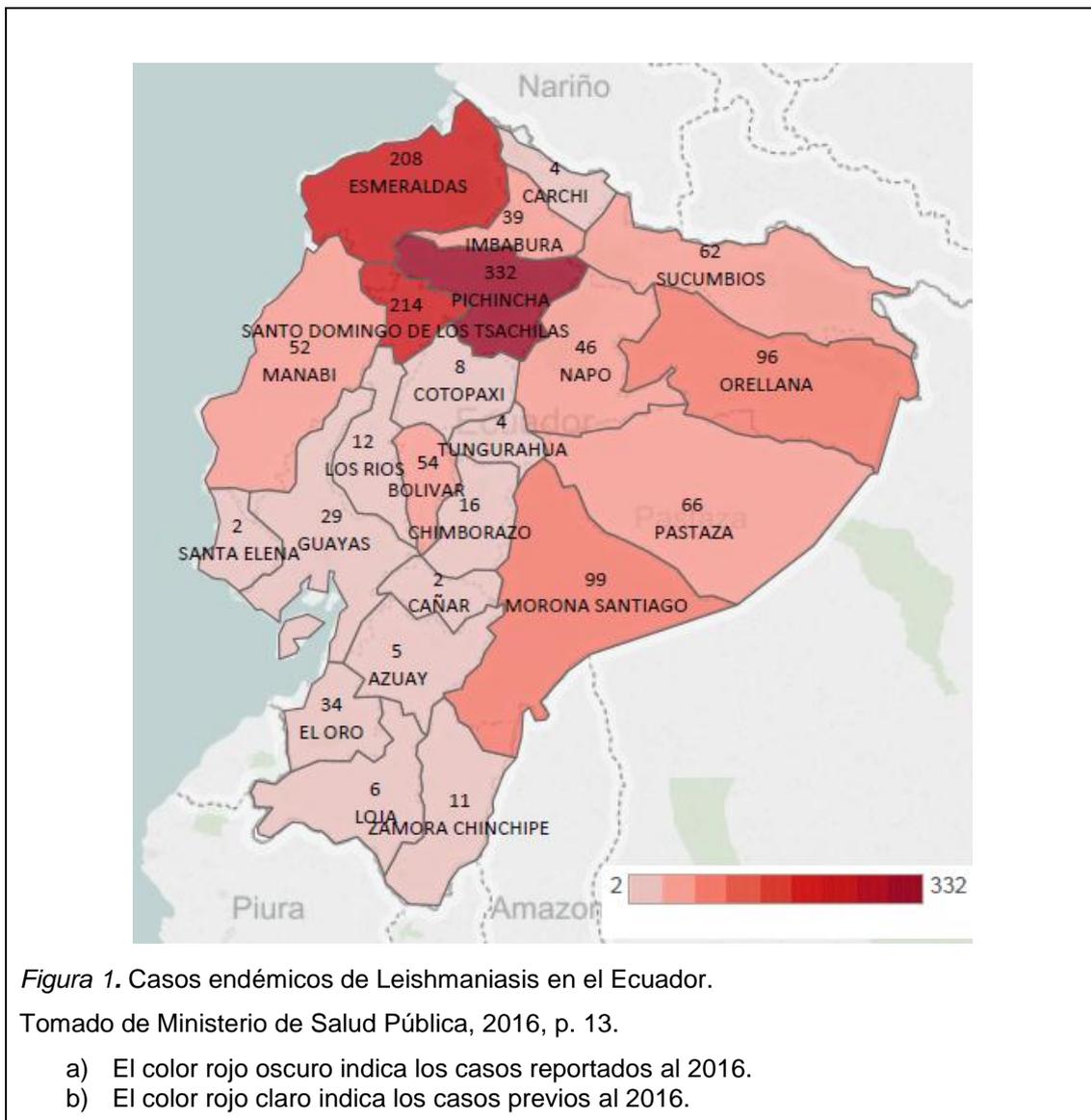


Figura 1. Casos endémicos de Leishmaniasis en el Ecuador.

Tomado de Ministerio de Salud Pública, 2016, p. 13.

- a) El color rojo oscuro indica los casos reportados al 2016.
- b) El color rojo claro indica los casos previos al 2016.

Según el Ministerio de Salud Pública, de datos reportados en la primera semana de enero del 2016 se observan 19 casos de Leishmaniasis cutánea, de los cuales las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas, Esmeraldas y Manabí presentaron el mayor número de casos. Del total de casos notificados en el 2016 Pichincha, Santo Domingo y Esmeraldas acumulan el 53,82% como se muestra en la Tabla 2 (MSP, 2016, p.13).

Tabla 2. Casos de leishmaniasis reportados en el Ecuador durante la primera semana de enero del 2016.

Provincia	2015	2016 semana1	Total
Pichincha	332		332
Santo Domingo	207	7	214
Esmeraldas	205	3	208
Morona Santiago	96	1	99
Orellana	94	2	96
Pastaza	66		66
Sucumbíos	62		62
Bolívar	54		54
Manabí	49	3	52
Napo	44	2	46
Imbabura	39		39
El oro	34		34
Guayas	29		29
Chimborazo	16		16
Los ríos	12		12
Zamora Chinchipe	11		11
Cotopaxi	7	1	8
Loja	6		6
Azuay	5		5
Carchi	4		4
Tungurahua	4		4
Cañar	2		2
Santa Elena	2		2
<b>Total general</b>	<b>1.382</b>	<b>19</b>	<b>1.401</b>

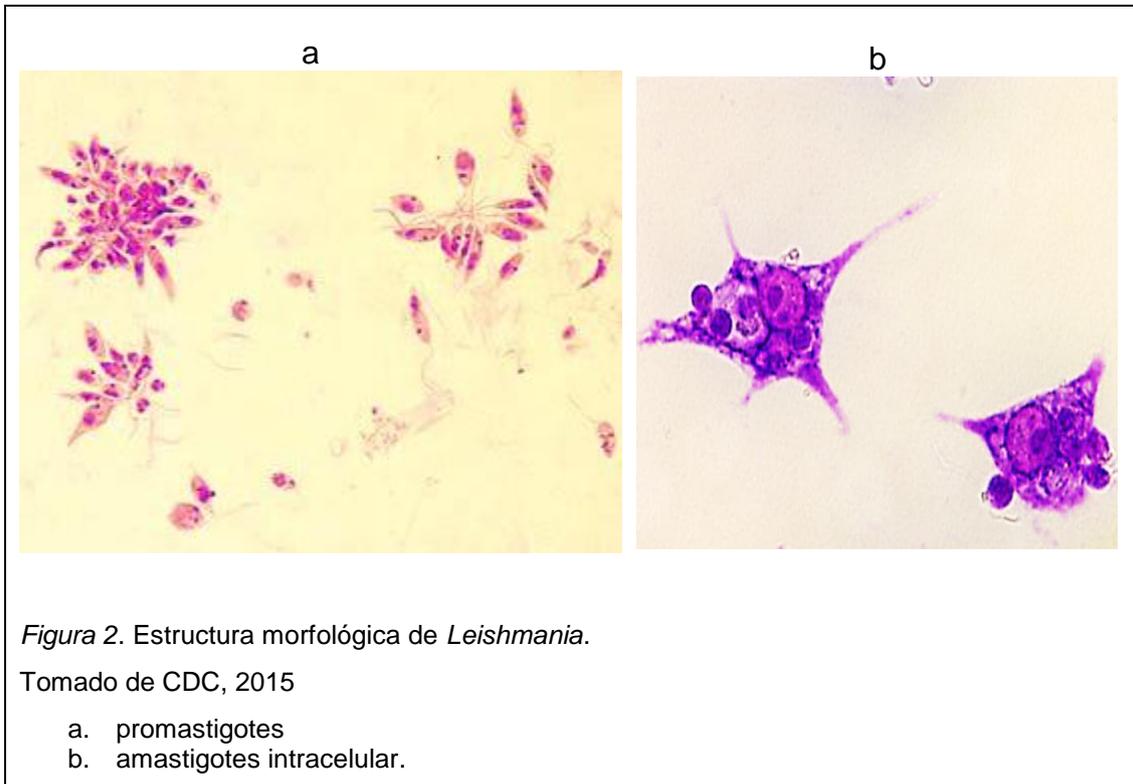
Tomado de Ministerio de Salud Pública, 2016, p.13.

## 2.2. Agente Causal

La *Leishmania* es un parásito que presenta dos formas morfológicas: promastigotes (Figura 2a) que está presente en el vector y amastigotes (Figura 2b) que se encuentra presente en el hospedero (Centro de Control y Prevención de Enfermedades [CDC], 2015).

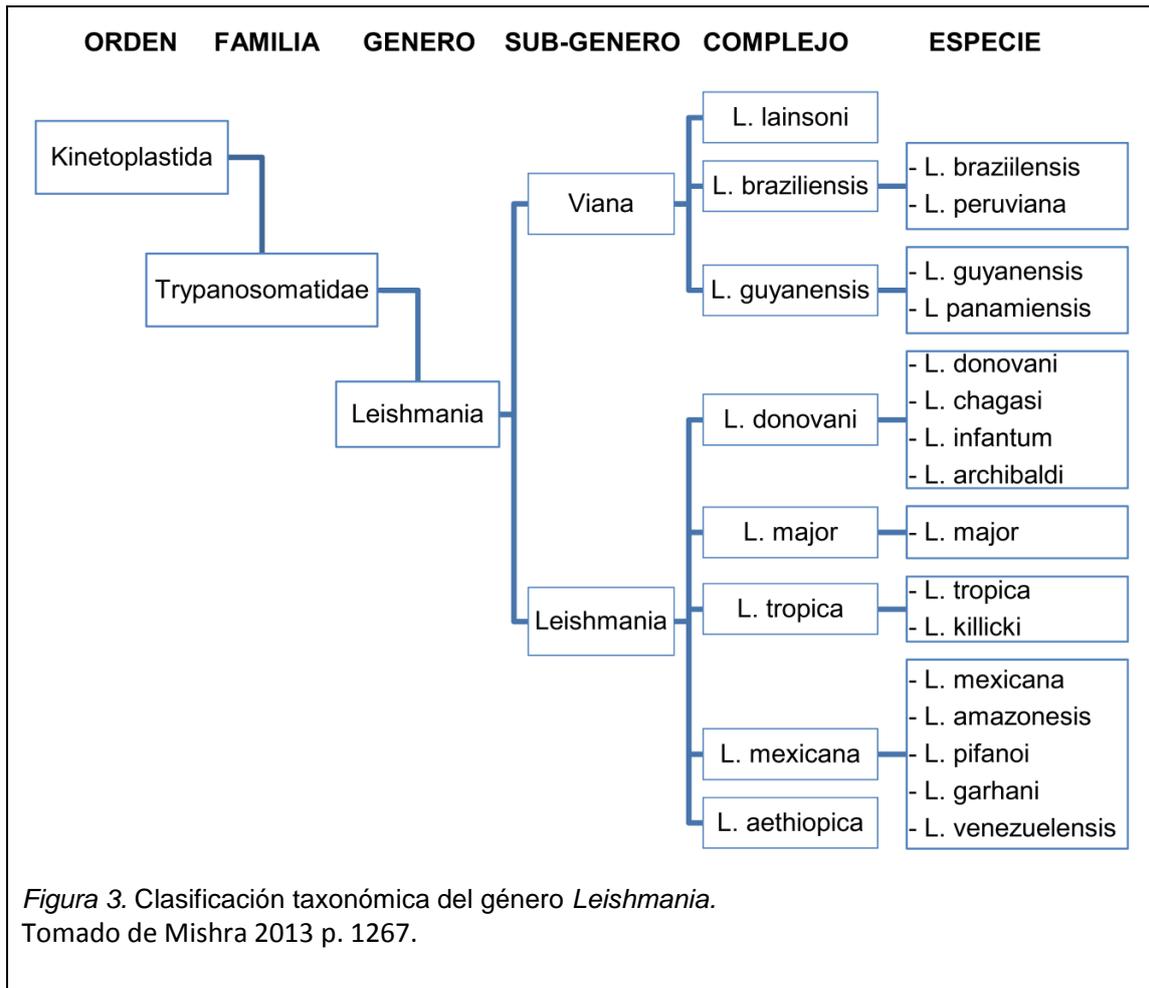
La forma promastigote o extracelular se encuentra presente en el tracto digestivo de la mosca de arena, son fusiformes, presentan un núcleo circular en la parte central y un kinetoplasto de donde se forma el flagelo móvil, tienen un diámetro de 15 a 28  $\mu\text{m}$  y su ancho mide entre 1,5 a 1,8  $\mu\text{m}$  (Mishra, Kishore y Tiwari, 2013, p. 1266). La forma amastigote permite que el parásito pueda

sobrevivir en el interior de las células del hospedero (Fiebig, Kelly y Gluenz, 2015, p.1). Son circulares u ovalados, presentan un núcleo voluminoso y vacuolas en el citoplasma, tienen una longitud de 2 a 3  $\mu\text{m}$  (Mishra *et al.*, 2013, pp. 1266-1267).



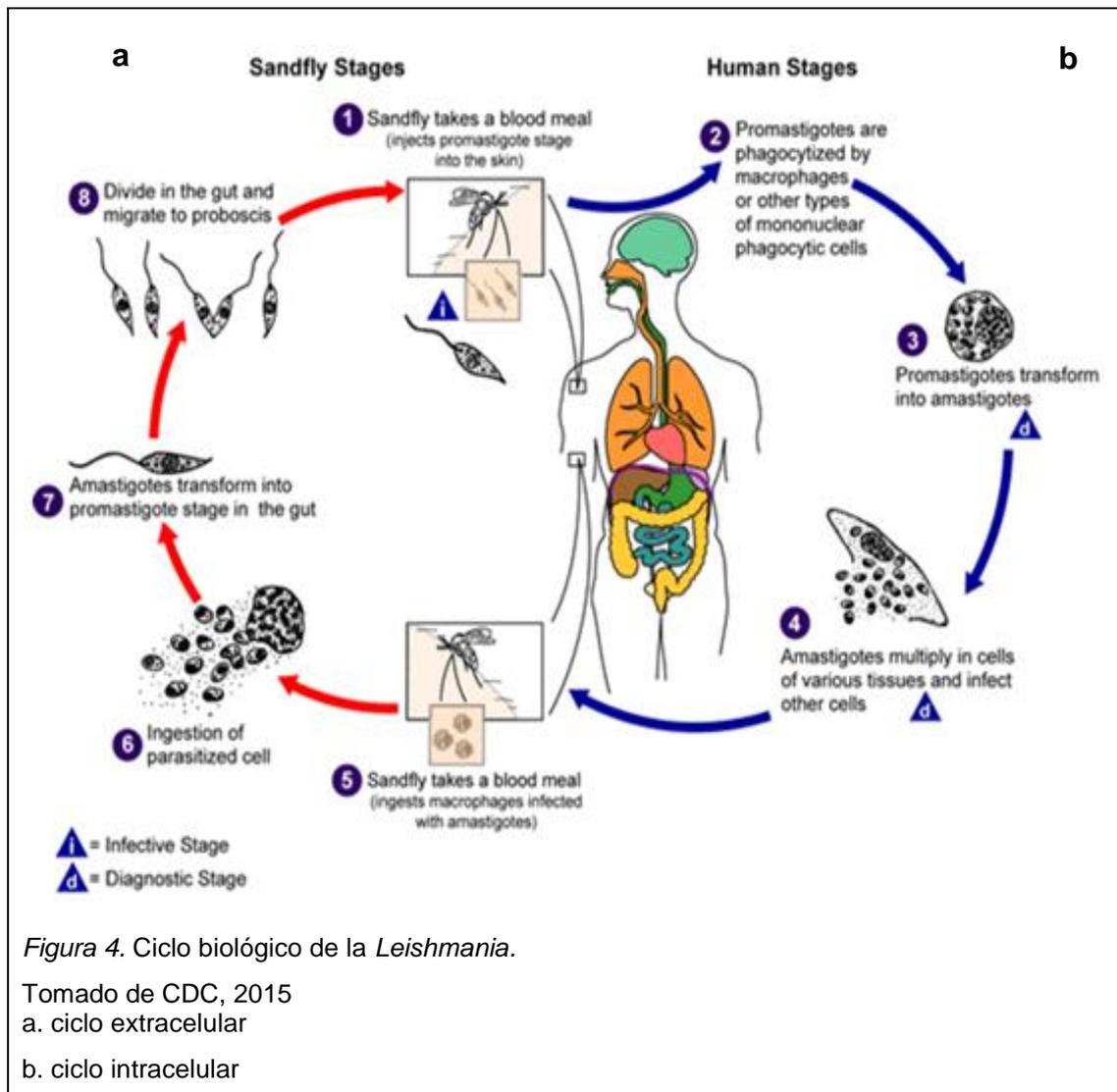
### 2.2.1. Clasificación Taxonómica

La *Leishmania* es un parásito protozoo intracelular, perteneciente a la familia *Trypanosomatidae* orden Kinetoplastida, género *Leishmania*. La clasificación del género *Leishmania* se ha basado en la taxonomía mundial obtenida desde el año 1990 mediante técnicas isoenzimáticas y moleculares (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2010). Es así que se tienen dos subgéneros: el subgénero *Leishmania*, presente en el Viejo Mundo y Nuevo Mundo y el sub género *Viannia* únicamente presente en el Nuevo Mundo (Figura 3) (Von Stebut, 2015, p. 194). En el Ecuador predominan las especies *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. panamiensis* y *L. braziliensis* (OMS, 2010).



### 2.2.2. Ciclo biológico

La transmisión comienza en la etapa de promastigote metacíclico, que se inocula en el hospedero por la picadura del insecto hembra flebótomos, inhibiendo a los macrófagos receptores para que la infección complete su ciclo (Montalvo, 2011, p. 9). El ciclo biológico de la especie *Leishmania* es considerado complejo (Figura 4) (CDC, 2015), debido a que abarca huéspedes vertebrados e invertebrados, además de dos ciclos, el intracelular (en humanos) y el extracelular (en la mosca).



El **ciclo intracelular** empieza cuando la hembra hematófaga deposita promastigotes metacíclicos en el hospedero **1**, los cuales se adhieren a los macrófagos y penetran el citoplasma como resultado de la fagocitosis. Los parásitos ingresan a la vacuola parasitófora, en donde los macrófagos tratan de eliminarlos mediante hidrolasas, lisozimas, óxido nítrico y secreción de ROS **2**. Una vez que los promastigotes ingresan a los macrófagos evaden su respuesta inespecífica convirtiéndose en amastigotes **3** los cuales se multiplican hasta liberarse al espacio intracelular para invadir nuevas células **4** (Bilbao, 2014, p.17).

En el **ciclo extracelular** de invertebrados las hembras hematófagas vuelven a

picar a nuevos hospederos e ingieren sangre infectada con amastigotes intracelulares **5** (Teixeira *et al*, 2013, p. 2). La sangre es transportada hacia el tracto gastrointestinal del vector, en donde los amastigotes se agrupan en una bolsa llamada matriz peritrófica (Figura 5) formando conglomerados **6** y se transforman en promastigotes procíclicos (forma replicativa) (Teixeira *et al*, 2013, p. 3). Los promastigotes procíclicos se agrupan en rosetas y se desarrollan en 2 o 3 días hasta tomar una forma alargada convirtiéndose en promastigotes nectomónados **7** (Bilbao, 2014, p.16), los cuales después de 3 o 7 días se transforman en promastigotes metacíclicos que son formas pequeñas, delgadas y muy móviles con un flagelo que mide el doble de su cuerpo con elevada infectividad e incapacidad de multiplicarse. Estos migran hacia el esófago, faringe y probóscide en dónde están listos para infectar a nuevos huéspedes mamíferos donde comienza el ciclo nuevamente **8** (Sainz, 2013, p. 29).

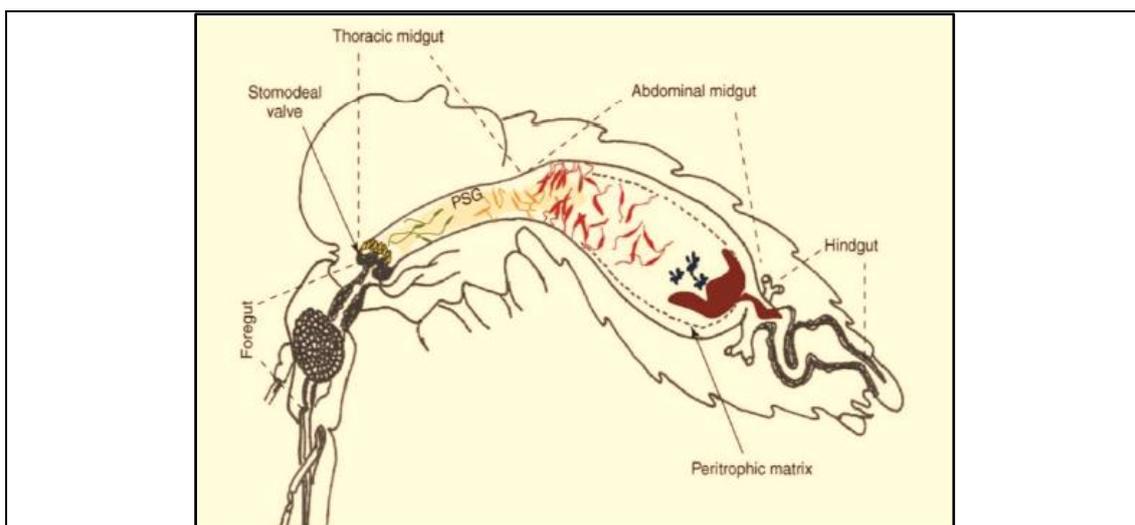
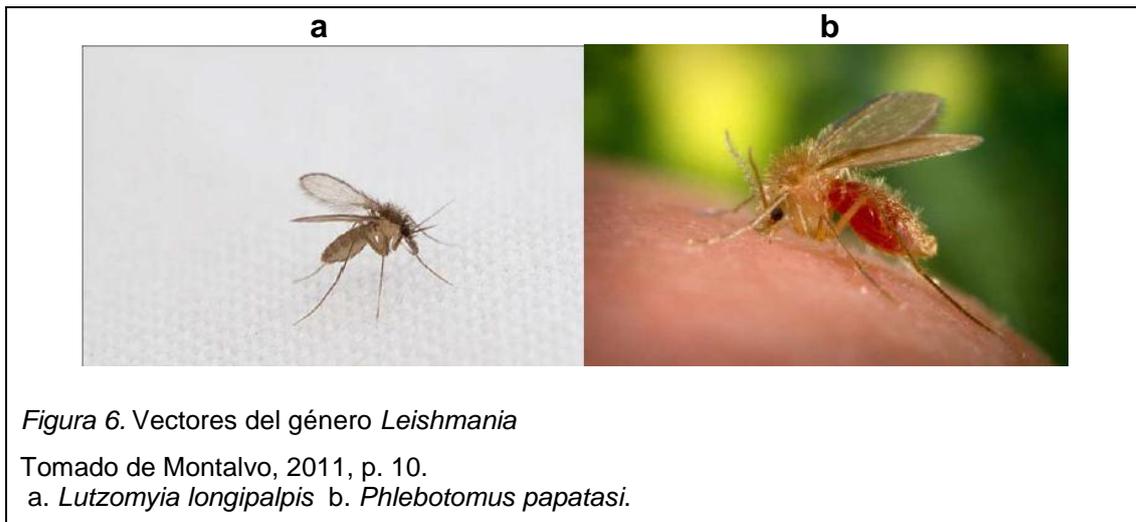


Figura 5. Desarrollo de diferentes formas de promastigotes en la mosca hembra.

Tomado de Sainz, 2013, p. 30.

a. Promastigotes procíclicos (Color azul), b. Nectomónados (Color rojo), c. Leptomónados (Color beige), d. Haptomónados (Color amarillo), y e. Metacíclicos (Color verde).

Los vectores pertenecen a los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus* (Figura 6), se han descubierto 500 especies de vectores de *Leishmania*, todas son hembras pertenecientes a la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae*, de las cuales 31 son pertenecientes a especies patógenas para el ser humano y 43 son considerados como probables vectores ( Montalvo, 2011, p. 10).



### 2.3. Manifestaciones Clínicas

Existen 3 formas clínicas de la *Leishmaniasis*: 1) cutánea, la forma más común, 2) visceral, la forma más grave y 3) mucocutánea (WHO. 2016). Un factor importante que determina el tipo de enfermedad es la inmunología del paciente infectado, siendo los niños y ancianos los más propensos a desarrollar la enfermedad (Von Stebut, 2015, p. 193).

#### 2.3.1. Leishmaniasis Cutánea

La leishmaniasis cutánea puede ser ocasionada por varias especies de *Leishmania* que son: *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica* en el viejo mundo (Hartley Drexler, Ronet, Beverley y Fasel, 2014, p. 3), y *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. braziliensis* en el nuevo mundo. (Hartley *et al*, 2014, p. 3). Esta enfermedad afecta al 90% de los pacientes, los cuales después de varias semanas o meses pasada la infección desarrollan un nódulo hasta producir úlceras que ocasionan daños en los tejidos de la piel (Von Stebut, 2015, pp. 194-195). Puede presentarse de tres formas: localizada, difusa y recidivante (Canese, Maciel y Oddone, 2011, p. 12).

En la **leishmaniasis cutánea localizada** se produce inicialmente una mácula, transformándose en una pápula hasta producir úlceras y formación de cicatrices hipertróficas con bordes de color púrpura (Figura 7). Las lesiones ocurren en un 60 % de las piernas y brazos, y un 40 % de la cara y orejas, en ocasiones los ganglios linfáticos se drenan y pueden verse comprometidos (Subsecretaría de Prevención y Promoción de Salud [SPPS], 2015, p. 14). El periodo de duración puede variar entre dos semanas a seis meses dependiendo de la especie de *Leishmania* involucrada y de la respuesta inmune del huésped (Corral, 2015, p. 18).



La **leishmaniasis cutánea difusa** se caracteriza por la presencia de múltiples lesiones en toda la piel con excepción de las plantas de los pies, palma de las manos, axilas y cabello (Figura 8). Una vez que la enfermedad se ha esparcido por todo el cuerpo, se forman nódulos que contienen muchos parásitos y pueden dañar el tejido óseo. El período de incubación es similar al de la leishmaniasis cutánea localizada (SPPS, 2015, p. 15).



Figura 8. Lesiones de leishmaniasis cutánea difusa.

Tomado de Von Stebut, 2015, p. 196.

Finalmente la **leishmaniasis cutánea recidivante** o también llamada Lupoide, es una manifestación clínica que puede reaparecer 8 años después de la infección, comienza con un leve desarrollo de las lesiones que se presentan como células grandes e histiocitos anormales. Los afectados que no reciben un tratamiento temprano pueden llegar a morir, debido a que este subtipo de leishmaniasis cutánea es letal (Von Stebut, 2015, pp. 194-195).

En el Ecuador la leishmaniasis cutánea localizada predomina en la región Amazónica e Interandina, la leishmaniasis cutánea difusa se encuentra en menor porcentaje en las zonas tropicales del Pacífico, y la leishmaniasis recidivante predomina en la zona subtropical (Calvopiña, Loor, Lara, Zambrano, y Hasiguchi, 2012, p. 32)

### 2.3.2. Leishmaniasis Visceral

La leishmaniasis visceral es una enfermedad del sistema fagocítico mononuclear que ataca gravemente los órganos principales del ser humano y de algunos animales mamíferos, siendo los niños menores a diez años los más vulnerables (OMS, 2010).

Esta enfermedad produce alrededor de 50 000 muertes cada año (Reveiz *et al*, 2013, p. 1) y los afectados pueden presentar síntomas como dolores

abdominales, pérdida de peso, fiebre, malestar, y diarrea (Von Stebut, 2015, p. 197). Una vez que ocurre la infección, los pacientes producen una hiperplasia reticuloendotelial con una marcada proliferación de los macrófagos y células plasmáticas, afectando el desarrollo normal del hígado, bazo, intestino delgado, ganglios linfáticos y médula ósea (Boelaert y Sundar, 2014, p. 638). El signo más llamativo es probablemente la presencia de los granulomas causados por la proliferación de los macrófagos activados, la supresión de líneas celulares de eritrocitos, trombocitos y leucocitos conduce al desarrollo de la pancitopenia en los casos más graves y avanzados (Figura 9) (Boelaert y Sundar, 2014, pp. 638). El período de incubación se da desde los 10 días hasta los 2 años (SPPS, 2015, p. 17), son posibles períodos de incubación más largos cuando las personas infectadas presentan una forma asintomática que albergan los parásitos intracelulares latentes y desarrollan la enfermedad muchos años después de la infección a causa de la terapia inmunosupresora o coinfecciones como el VIH (SPPS, 2015, p. 6).



Figura 9. Leishmaniasis visceral, esplenomegalia en un paciente etíope.  
Tomado de Boelart, 2014.

Este tipo de leishmaniasis se encuentra en el Viejo Mundo y en el Nuevo Mundo causada principalmente por *L. donovani* y *L. infantum* respectivamente (OMS, 2010). Sin embargo, en el Ecuador no se han reportado casos de leishmaniasis visceral (Calvopiña *et al*, 2012, p. 32).

### 2.3.3. Leishmaniasis Mucocutánea

La leishmaniasis mucocutánea se caracteriza por la presencia de úlceras eritematosas en membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta, las cuales se desarrollan hasta producir una perforación y destrucción del tabique nasal afectando al sistema respiratorio (OMS, 2010). Alrededor del 10 % de los afectados pueden desarrollar este tipo de manifestación clínica (David y Craft, 2009, pp. 497), mientras que las personas que más daños presentan son aquellas que poseen múltiples lesiones primarias (Von Stebut, 2015, p. 195). La enfermedad comienza con una obstrucción de la mucosa nasal, originando una úlcera que ocasiona una deformación en las vías respiratorias (Figura 10) (Corral, 2015, p. 20), afectando a la laringe, faringe y el paladar. Su período de incubación puede durar una semana o varios meses (SPPS, 2015, pp. 15-16).



En el Ecuador, se han reportado 3 casos de Leishmaniasis mucocutánea, 1 caso en la provincia del Azuay y 2 casos en la provincia de Bolívar hasta la primera semana de enero del 2016 (MSP, 2016).

### 2.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la leishmaniasis se realiza identificando lesiones mucocutáneas, daños en la piel, médula ósea y ganglios linfáticos (Chena,

Nara, Canese, Oddone y Russomando, 2013, p. 47), y los métodos de diagnóstico son utilizados de acuerdo a la manifestación clínica que el paciente presente (Boelaert y Sundar, 2014, p. 643).

#### **2.4.1. Diagnóstico en Leishmaniasis Visceral**

Los pacientes que tengan fiebre de más de dos semanas en un área endémica, esplenomegalia y pérdida de peso, se los puede considerar como un caso clínico sospechoso. El diagnóstico se ejecuta mediante un examen microscópico para visualizar el parásito en etapa de amastigotes. Primero se realiza un aspirado que puede ser de los ganglios linfáticos, bazo o médula ósea, y luego se coloca el tejido infectado en el portaobjetos, se realiza un frotis y se tiñe con un colorante que puede ser Romanowsky, Giemsa, Wright o May Grünwald-Giemsa (Boelaert y Sundar, 2014, p. 643), luego de lo cual, se visualiza bajo el microscopio el núcleo y el cinetoplasto de los parásitos (De Vries, Reedijk y Shallig, 2015, p. 101). La sensibilidad de este método varía según la muestra que puede ser desde 53 hasta 99 %, mientras que la precisión del examen depende de la carga parasitaria, la calidad de los reactivos y habilidad del laboratorista (Boelaert y Sundar, 2014, p. 643). Se puede aumentar la sensibilidad de detección de los parásitos mediante el uso de técnicas moleculares como PCR o medios de cultivo. Las pruebas serológicas han sido desarrolladas para detectar leishmaniasis visceral, y se han utilizado en distintas áreas endémicas demostrando variabilidad en sus resultados (Boelaert y Sundar, 2014, pp. 642-643).

Para el cultivo de los parásitos se utiliza **medios de cultivo** monofásicos y bifásicos, los medios monofásicos son RPMI y Schneider suplementados con glutamina y suero fetal bovino (FBS) al 30 %, mientras que en los bifásicos podemos destacar como principal al NNN modificado o Medio Novy - Nicolle – Mcneal con sangre de conejo desfibrinada, medio EMTM o el BHI. Antes de usarlos se realiza un ensayo para identificar el crecimiento y proliferación de los parásitos, en algunos casos el FBS puede producir contaminación por lo que se

añaden de manera alternativa antimicóticos como la flucitosina y antimicrobianos como la gentamicina. Los medios bifásicos se preparan fácilmente, son de bajo costo, y en siete días se puede observar la fase estacionaria de los parásitos bajo el microscopio invertido. La temperatura de incubación es de 20 a 25 °C para el crecimiento de los parásitos de *Leishmania* (Montealegre, 2010, pp. 128-132).

También se utilizan **técnicas moleculares** como la Reacción de la Cadena Polimerasa (PCR), técnica mediante la cual se obtiene múltiples copias de un fragmento de ADN (Chena *et al*, 2013, p. 46) y que permite identificar el ADN de varias especies del género *Leishmania* utilizando la parte central del gen de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU rRNA) (Lemrani, Hamdi, Laamrani y Hassar, 2009, pp. 115-116). Esta técnica detecta parásitos una semana antes de que el paciente presente síntomas, por lo que mediante esta detección se podría prevenir el desarrollo de manifestaciones clínicas (Tsokana *et al*, 2014, p.162).

Las **pruebas serológicas** han demostrado una muy buena eficacia en el diagnóstico de enfermedades (Boelaert y Sundar, 2014, pp. 643-644). Entre las diferentes pruebas serológicas usadas en leishmaniasis se tienen: la prueba de aglutinación directa (DAT), el ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayo de flujo lateral, Western Blot y prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (De Vries *et al*, 2015, p. 101). La prueba de aglutinación directa (DAT) es la prueba serológica más utilizada, tiene como función identificar anticuerpos de *L. donovani* en la sangre de las personas infectadas. Consiste en una suspensión liofilizada de cultivos tratados con tripsina en la cual la visualización de resultados positivos ocurre después de 18 horas de tratamiento con el anticuerpo de *L. donovani*, el cual reconoce al antígeno que se encuentra en el pocillo de la microplaca marcándola de color celeste (Adams, Jacquet, Schoone, Gidwani, y Boelaert, 2012, p. 2).

#### **2.4.2. Diagnóstico en Leishmaniasis Cutánea**

Los pacientes que presentan este tipo de enfermedad poseen adicionalmente infecciones en la piel por estafilococos, lepra, micosis, y úlceras. Si el tratamiento no tiene especificidad y se vuelve costoso, se realiza un diagnóstico mediante la prueba cutánea de *Leishmania* o prueba de Montenegro (Boelaert y Sundar, 2014, p. 644).

La prueba de Montenegro es un método indirecto para identificar la leishmaniasis cutánea (De Vries *et al*, 2015, p.101), que consiste en colocar una inyección que contiene una solución antigénica para promastigotes de *Leishmania* en la parte anterior del brazo, una vez transcurrido 48 o 72 horas, el endurecimiento del tejido es medido, teniendo en cuenta que si este es de alrededor de 5 mm la prueba se considera positiva (Boelaert y Sundar, 2014, p. 644). Esta prueba tiene la ventaja de detectar lesiones aun cuando la carga parasitaria es baja (Sadeghian, Ziaei, Bidabadi y Ali Nilforoushzadeh, 2013, p. 239), sin embargo, son necesarios el uso de otros medios de cultivo para producir el antígeno y además, no reconoce a personas que ya han presentado la enfermedad con anterioridad (De Vries *et al*, 2015, p. 102). La sensibilidad alcanza más del 90 % y su especificidad varía alrededor del 75 % (Gomes *et al*, 2014, p. 706).

#### **2.4.3. Diagnóstico en Leishmaniasis Mucocutánea**

Los afectados presentan lesiones en la mucosa, además de enfermedades como rinitis y sarcoidosis. La confirmación de la manifestación clínica es difícil debido a la poca cantidad de muestras que se obtienen, el diagnóstico en muestras de mucosa se puede realizar mediante un examen microscópico, pruebas serológicas o PCR (Boelaert y Sundar, 2014, p. 645).

## 2.5. Tratamiento

El tratamiento de la leishmaniasis es complejo porque depende de la forma clínica, la especie causante y la eficacia del fármaco (Tabla 3) (Hodiamont *et al*, 2014, p. 1). Existen pocos fármacos anti-*Leishmania* que son altamente eficaces, pero su eficacia depende de la vía de administración y el tiempo de consumo del paciente, sin embargo, al ser estos muy tóxicos, muchas de las personas afectadas suspenden el tratamiento debido a los efectos secundarios que les provoca (Freitas, Chatelain, Andrade y Siqueira, 2012, p. 12)

Tabla 3. Terapias utilizadas según la geografía de la infección y la especie de *Leishmania*

Forma Clínica	Localización	Especie	Tratamiento	Eficacia
Leishmaniasis Visceral	Viejo Mundo	<i>L. donovani</i> (Sudáfrica)	Anfotericina B Liposomal	97 %
		<i>L. donovani</i> (Este de África)		83 %
		<i>L. infantum</i>		98 %
Leishmaniasis Cutánea	Viejo Mundo	<i>L. donovani</i>	Antimoniales pentavalentes y Crioterapia	N/A
		<i>L. infantum</i>		100 %
		<i>L. tropica</i>		78 %
		<i>L. major</i>		83 %
		<i>L. aethiopica</i>		N/A
	Nuevo Mundo	<i>L. mexicana</i>		N/A
		<i>L. amazonensis</i>		N/A
		<i>L. braziliensis</i>		78 %
		<i>L. panamensis</i>		N/A
		<i>L. naiffi</i>		N/A
		<i>L. guyanensis</i>	Isetionato de Pentamidina	87 %
Leishmaniasis Mucocutánea	Nuevo Mundo	<i>L. amazonensis</i>	N/A	N/A
		<i>L. braziliensis</i>	Antimoniales Pentavalentes y Pentoxifilina	97 %
		<i>L. panamensis</i>	N/A	N/A

Nota: N/A quiere decir no disponible. Tomado de Hodiamont *et al*, 2014, pp. 4-7.

Los medicamentos más utilizados para el tratamiento de esta enfermedad son compuestos pentavalentes de antimonio (Pentostam, Glucantime<sup>®</sup>), pero debido a la resistencia que han generado en los parásitos, se utilizan también fármacos de segunda línea como Pentamidina, Anfotericina B, Miltefocina, AmBisome, Fluconazol y Paromomicina, principalmente (Tabla 4) (Mohapatra, 2014, pp. 4-9) (Croft y Olliaro, 2011, p. 1479). Los antimoniales

pentavalentes han sido utilizados para el tratamiento de la Leishmaniasis desde 1940 (Frezard, Demicheli y Ribeiro, 2009, p. 2318) y se usan con una dosis diaria recomendada de 10-20 mg Sb / kg de peso corporal administrados durante 1 mes. Los efectos adversos observados incluyen dolor musculoesquelético, trastornos gastrointestinales y dolor de cabeza (Oliveira *et al*, 2011, p. 93). En el mecanismo de acción hay una  $\beta$  oxidación de los ácidos grasos del parásito e inhibición de la glicólisis (Kaur y Rajput, 2014, p. 2).

Tabla 4. Medicamentos utilizados en el tratamiento de la Leishmaniasis.

MEDICAMENTO	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	TOXICIDAD	EFICACIA	PRECIO
<b>Antimoniales pentavalentes</b>	Intravenosa, Intramuscular, Intralinfática.	Cardiotoxicidad, pancreatitis, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad	35–95%	\$50-70
<b>Anfotericina B</b>	Intravenosa	Nefrotoxicidad	>90%	~ \$100
<b>Anfotericina B Liposomal</b>	Intravenosa	Rigores y escalofríos durante la infusión	>97%	~ \$280
<b>Sulfato de paromomicina</b>	Intramuscular	Nefrotoxicidad, ototoxicidad, hepatotoxicidad	94%	~ \$10
<b>Miltefosina</b>	Oral	Gastrointestinal, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, teratogénesis	94–97%	~ \$70

Nota: El precio mostrado corresponde al tratamiento completo

Tomado de Freitas *et al*, 2012, p 12.

La Anfotericina B es un medicamento de segunda línea, y debido a su toxicidad, se han desarrollado 3 presentaciones para su aplicación: Anfotericina B Liposomal (Ambisome), Anfotericina Compleja (Abelcet) y Anfotericina B de Dispersión Coloidal (Amphocil) (Hodiamont *et al*, 2014, p. 9). La dosis diaria recomendada es de 5-20 mg/ kg de peso corporal durante 20 días (Freitas *et al*, 2012, p. 12), los efectos secundarios reportados son leves e incluyen fiebre, escalofríos, dolor de espalda y trombocitopenia (Boelaert y Sundar, 2014, p. 646). Su mecanismo de acción se da por la variación de la permeabilidad selectiva de K y Mg que tienen como función enlazar los esteroides de la

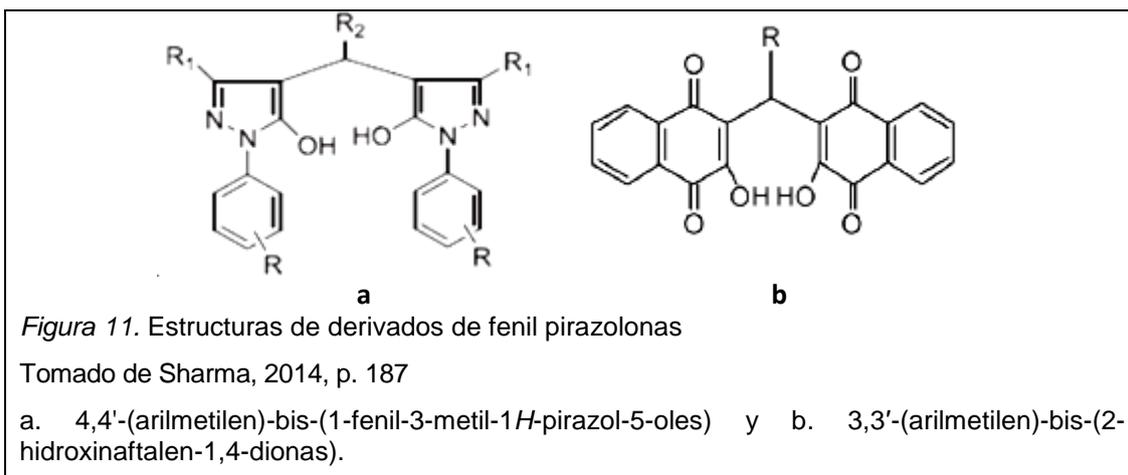
membrana (Kaur y Rajput, 2014, p. 2).

## **2.6. 4,4'-(Arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles)**

Los pirazoles y sus derivados son heterociclos importantes en la industria farmacéutica debido a que son la base de la estructura de varios componentes biológicamente activos como antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios (Gupta, Kumar, Bansal y Halve, 2015, pp. 25-29). Pero cuando se utilizan a dosis elevadas los pirazoles pueden provocar reacciones alérgicas y otros efectos nocivos, como toxicidad renal y hepática (Domiaty, El-Mallah, Ghoneim, Bekhit y El-Razik, 2016, p. 9).

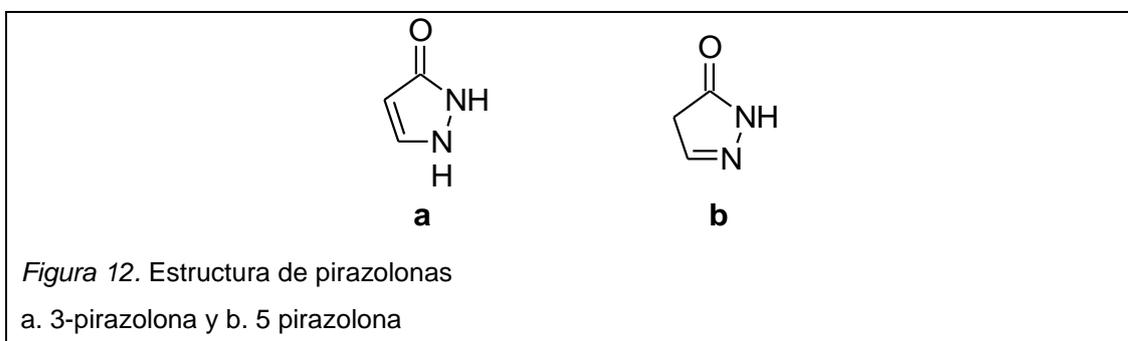
Los medicamentos efectivos contra las tres manifestaciones clínicas de la Leishmaniasis son muy pocos, por lo que las investigaciones se han ido centrando en desarrollar tratamientos alternativos frente a esta enfermedad. Los principios activos se los puede obtener de dos fuentes, la primera mediante extracción a partir de productos naturales y la segunda mediante la síntesis química de los mismos. Una cosa que hay que recalcar es que es común encontrar al menos un sistema heterocíclico en la estructura de estos principios activos (Gomtsyan, 2012, pp. 7-9).

Los derivados de fenil pirazolonas son compuestos orgánicos cíclicos que pese a no mostrar una buena actividad leishmanicida (Gehrke, 2012, pp. 190-199), son interesantes porque son intermediarios en la síntesis de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles), los cuales presentan una estructura central semejante a varias 3,3'-(arilmetilen)-bis-(2-hidroxinaftalen-1,4-dionas) que poseen una potente actividad leishmanicida (Figura 11) (Sharma *et al*, 2014, pp. 185-189).



### 2.6.1. Propiedades

Las pirazolonas son compuestos heterocíclicos, que poseen un anillo de 5 miembros que contiene dos átomos de nitrógeno y un grupo cetona en su estructura (Figura 12) (Gupta, Gupta y Halve, 2015, p.2291).

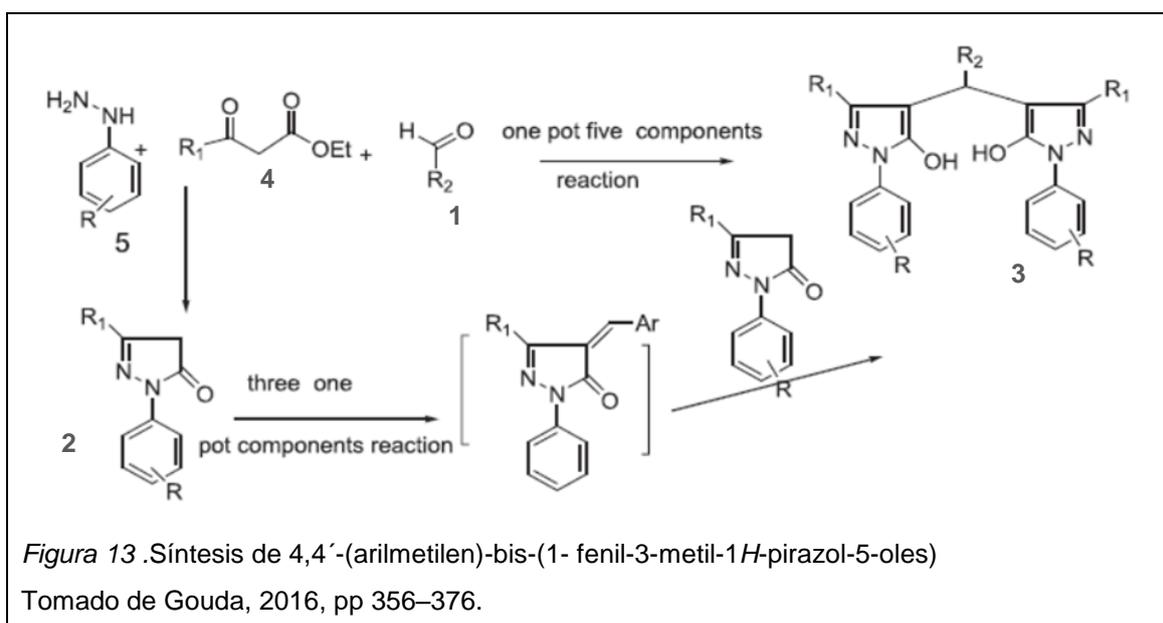


Los derivados de pirazolonas son una clase importante de compuestos heterocíclicos que se encuentran en muchos medicamentos y productos sintéticos. Estos compuestos tienen un amplio rango de actividades biológicas como por ejemplo: analgésicas, anti-inflamatoria, antioxidantes antituberculosas, antifúngicas, antibacterianas, y antitumorales. Debido a su fácil preparación y la gran actividad biológica que poseen, están ganando importancia, especialmente en los programas de descubrimiento de fármacos (Gupta *et al*, 2015, pp. 25-29).

Derivados de 2,4-dihidro-3*H*-pirazol-3-ona (5-pirazolona), incluyendo 4,4'-(arilmetileno)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles), tienen un amplio espectro de actividades biológicas reportadas y han sido usados como agentes antiinflamatorios, antipiréticos, estimulantes de secreciones gástricas, antidepresivos, antibacteriales y antifilariales. Asimismo, estos pirazol-5-oles se han usado como fungicidas, pesticidas, insecticidas, colorantes y como agentes quelantes para extraer diferentes iones metálicos y ligandos (Niknam y Mirzaee, 2011, pp. 2403–2413), además de intermediarios en síntesis orgánica (Shirini, Seddighi, Mazloumi, Makhsous y Abedini, 2015, p. 291).

### 2.6.2. Síntesis de 4,4'-(arilmetileno)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles)

El método convencional para la síntesis de 4,4'-(arilmetileno)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles) **3** consiste en la reacción de un aldehído aromático **1** con una arilpirazolona **2**, la cual se obtiene por la condensación entre el acetoacetato de etilo (**4**) y una arilhidracina **5**. Estas reacciones pueden llevarse a cabo de forma separada o en un solo paso ya sea por una reacción de 5 componentes (Hasaninejed, Kazerooni y Zare, 2013, pp. 679–684) o una de 3 (Figura 13). En la actualidad la mayoría de los métodos reportados para esta síntesis consiste en la condensación en un solo paso de tres componentes entre 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona con diferentes aldehídos aromáticos (Tale, Tiwari y Karade, 2011, pp. 1415–1418).



## CAPITULO III. METODOLOGÍA

### 3.1. Esquema de la experimentación

El esquema propuesto para el desarrollo de la investigación se muestra a continuación:

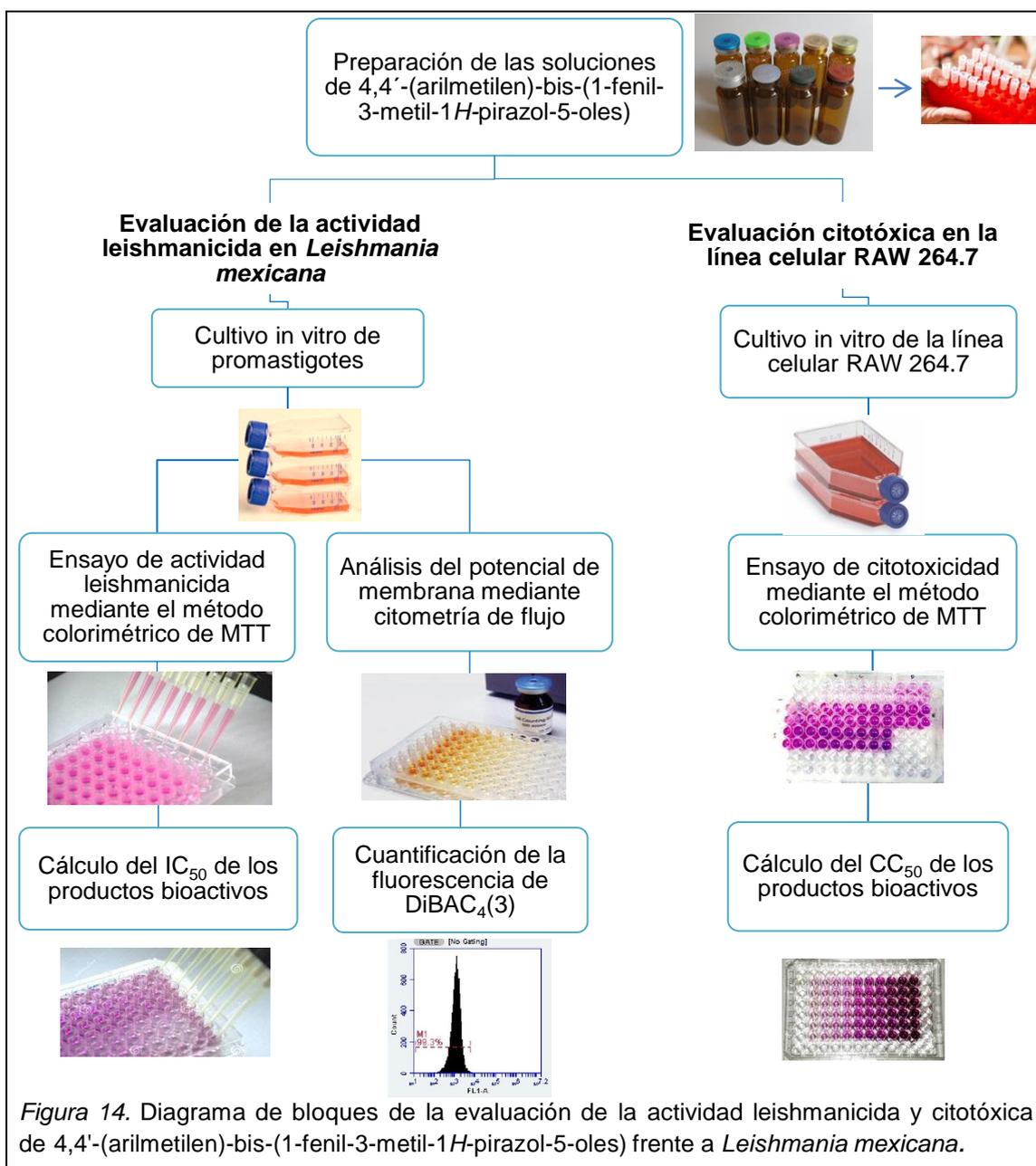
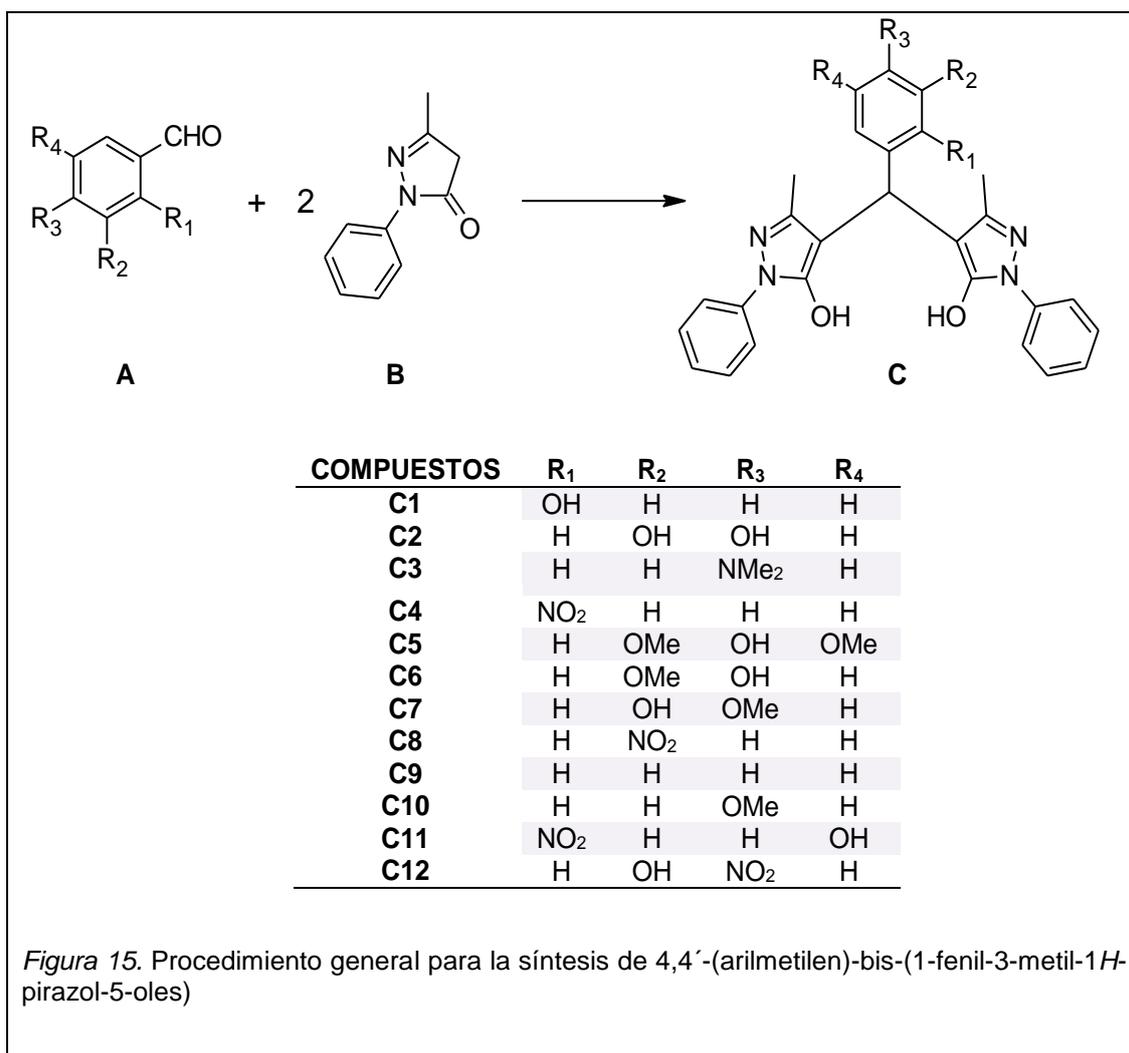


Figura 14. Diagrama de bloques de la evaluación de la actividad leishmanicida y citotóxica de 4,4'-(arilmtilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-oles) frente a *Leishmania mexicana*.

### 3.2. Síntesis de los compuestos químicos

Los 4,4'-(arilmétalen)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles) **C1-C12** fueron sintetizados por el Dr. Jorge Heredia, docente-investigador del CIT, mediante la reacción de 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona **B** con varios aldehídos aromáticos **A1-A12**, usando como solvente una mezcla de etanol-agua (Hasaninejed *et al.*, 2013, pp. 679–684) tal como se representa en el figura 15.



Las soluciones de los 12 compuestos químicos se prepararon usando dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) como solvente a concentraciones de 100  $\mu$ M y 300  $\mu$ M, se hicieron alícuotas y se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

### 3.3. Cultivo in vitro de promastigotes de *Leishmania mexicana*

La cepa de *Leishmania mexicana* fue donada por el Instituto de Enfermedades Tropicales de Lima-Perú. Los promastigotes de *L. mexicana* fueron mantenidos en medio Schneider Drosophila (SDM, Gibco®) suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado (FBS, Eurobio), y 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina (Gibco®) en una dilución de 2:6 parásitos/medio a 24°C durante 4 días de incubación (Ganfón *et al.*, 2012, p. 412).

### 3.4. Ensayo in vitro de la actividad leishmanicida de los pirazoles en promastigotes de *Leishmania mexicana*

La actividad de los compuestos se evaluó mediante el método colorimétrico del bromuro de etidio, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich) La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido mediante la transformación de la molécula MTT por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas (Quent, Loessner, Friis, Reichert y Hutmacher, 2010, p.1003).

Para los ensayos se sembró 100 µL de promastigotes en fase de crecimiento logarítmico ( $1.0 \times 10^6$  parásitos/mL) en una microplaca de 96 pocillos (Dutta, Bandyopadhyay, Mandal, y Chatterjee, 2005, p. 119). Posteriormente se colocó los 12 compuestos **C1-C12** a una concentración de 100µM en cada pocillo, como controles se usó Anfotericina (100µg/mL) (Sigma-Aldrich) y DMSO (Sigma-Aldrich), las placas fueron incubadas durante 12h, 24h y 48h a 24°C. Transcurrido el tiempo de incubación se colocó 10 µL de una solución de MTT en Phosphate-Buffered (PBS, Gibco®) (5mg/mL) y se dejó incubar durante 4h a 24°C (Ezatpour, Saedi Dezaki, Mahmoudvand, Azadpour y Ezzatkah, 2015, p. 2). El formazán fue solubilizado utilizando 100 µL de una solución STOP preparada con 15mL de isopropanol, 3g de dodecil sulfato de sodio (SDS) y 35mL de agua destilada (Hernández *et al.*, 2015, p. 4). Finalmente, las lecturas de las absorbancias se realizaron en un espectrofotómetro BioTek Synergy HT a 570 y 630 nm (Graziose *et al.*, 2012, pp. 457-458). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### 3.5. Determinación de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) de los compuestos bioactivos en promastigotes de *L. mexicana*

La actividad de los compuestos bioactivos se evaluó mediante el cálculo de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) utilizando el método colorimétrico del bromuro de etidio, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Para los ensayos se sembró 100 µL de promastigotes en fase de crecimiento logarítmico ( $1.0 \times 10^6$  parásitos/mL) en una microplaca de 96 pocillos. Se utilizó diluciones en serie de los compuestos bioactivos a distintas concentraciones (300 a 4µM) manteniendo todo el tiempo una concentración de DMSO al 1% (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración de los compuestos bioactivos

Diluciones de los compuestos bioactivos	Concentración [µM]
D1	300
D2	150
D3	75
D4	37,5
D5	18,75
D6	9,375
D7	4,68

Como controles se usó Anfotericina (100µg/mL) y DMSO, las placas fueron incubadas durante 24h a 24°C. Transcurrido el tiempo de incubación se colocó 10 µL de una solución de MTT en PBS (5mg/mL) y se dejó incubar durante 4h a 24°C (Ezatpour *et al.*, 2015, p. 2). El formazán fue solubilizado utilizando 100 µL de una solución STOP preparada con 15mL de isopropanol, 3g de dodecil sulfato de sodio (SDS) y 35mL de agua destilada (Hernández *et al.*, 2015, p. 4). Finalmente, las lecturas de las absorbancias se realizaron en un espectrofotómetro BioTek Synergy HT a 570 y 630 nm (Graziose *et al.*, 2012, pp. 457-458). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### 3.6. Cultivo in vitro de macrófagos RAW 264.7

La línea celular RAW 264.7 (MØ) de ratón fue donada por la Universidad de Rutgers-New Brunswick. Las células fueron sembradas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Gibco®) suplementado con 10% de FBS y 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa (Mahmoudvand *et al.*, 2015, p. 22).

### 3.7. Ensayo in vitro de la citotoxicidad de los pirazoles en macrófagos RAW 264.7

La citotoxicidad de los compuestos bioactivos fue evaluada frente a macrófagos RAW 264.7 mediante el cálculo de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) usando el método colorimétrico del MTT.

Para los ensayos se sembró 100 µL de macrófagos con una densidad de 5x10<sup>5</sup> células/mL en una microplaca de 96 pocillos. Posteriormente se colocó los 12 compuestos **C1-C12** a una concentración de 300µM en cada pocillo, como controles se utilizó Podofilotoxina (100µg/mL, Sigma-Aldrich), Anfotericina (100µg/mL) y DMSO (1%), las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa. Transcurrido este periodo se colocó 10 µL de una solución de MTT en PBS (5 mg/mL) y se dejó incubar durante 1 hora a 37°C (Riss *et al.*, 2015, p. 4). Posteriormente se centrifugó la placa a 3700 rpm durante 10 min, se aspiró el sobrenadante y se colocó 100 µL de DMSO al 100% (Sáenz, 2010, pp. 99). Finalmente, las lecturas de las absorbancias se realizaron en un espectrofotómetro BioTek a 570 y 630 nm, cada ensayo se realizó por triplicado (Graziose *et al.*, 2012, pp. 457-458). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **3.8. Determinación de la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) de los compuestos bioactivos en macrófagos RAW 264.7**

Para los ensayos se sembró 100 µL de macrófagos con una densidad de  $5 \times 10^5$  células/mL en una microplaca de 96 pocillos. Se utilizó diluciones en serie de los compuestos bioactivos a distintas concentraciones (300 a 4µM) (Tabla 5).

Como controles se utilizó Podofilotoxina (100µg/mL), Anfotericina (100µg/mL) y DMSO (1%), las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa. Transcurrido este periodo se colocó 10 µL de una solución de MTT en PBS (5 mg/mL) y se dejó incubar durante 1 hora a 37°C (Riss *et al.*, 2015, p. 4). Posteriormente se centrifugó la placa a 3700 rpm durante 10 min, se aspiró el sobrenadante y se colocó 100 µL de DMSO al 100% (Sáenz, 2010, pp. 99). Finalmente, las lecturas de las absorbancias se realizaron en un espectrofotómetro BioTek a 570 y 630 nm, cada ensayo se realizó por triplicado (Graziose *et al.*, 2012, pp. 457-458). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **3.9. Análisis del daño de potencial de membrana en promastigotes mediante citometría de flujo**

Se evaluó el mecanismo de acción de los compuestos sobre el potencial de membrana de *L. mexicana* mediante la cuantificación de la fluorescencia generada por DiBAC<sub>4</sub>(3) (ácido bis-(1,3-dibutilbarbiturico) trimetin oxonol, Sigma-Aldrich) frente a los parásitos. El fluoróforo DiBAC<sub>4</sub>(3) tiene un alto grado de sensibilidad de tensión que le permite ingresar en las células despolarizadas donde se une a las proteínas intracelulares o membrana emitiendo una fluorescencia verde, y por el contrario, la hiperpolarización se muestra por una disminución de la fluorescencia (Plock, Sokolowska-Kohler y Presber, 2001, pp. 141-152).

Para los ensayos se sembró 100 µL de promastigotes en fase de crecimiento logarítmico ( $1.0 \times 10^6$  parásitos/mL) en una microplaca de 96 pocillos de fondo

cónico. Se utilizó una concentración alta y una intermedia de los compuestos bioactivos obtenidas en el cálculo de IC<sub>50</sub> manteniendo todo el tiempo una concentración de DMSO al 1%, como controles se usó Anfotericina (100µg/mL), DiBAC<sub>4</sub>(3) (10 µg/mL) y Digitonina [25µM] (Sigma-Aldrich). Las placas fueron incubadas durante 30 minutos y 24 horas a 24°C, transcurrido cada periodo se colocó 1 µL del fluoróforo DiBAC<sub>4</sub>(3) (1 µg/mL) en cada pocillo y se dejó incubar por 10 minutos a 24°C.

Para la lectura se midió 1x10<sup>4</sup> eventos por cada ensayo con el filtro óptico FL1 que detecta la emisión entre 533/30 nm (Plock *et al.*, 2001, pp.141-152). Finalmente los datos se analizaron en el software BD CSampler™ Analysis Software.

### 3.10. Análisis de estadístico

Para determinar el porcentaje de viabilidad celular en promastigotes y macrófagos después del tratamiento con los compuestos se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Viabilidad Celular} = \left[ \frac{(A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}})}{(A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}})} \right] * 100 \quad (\text{Ecuación.1})$$

(Sun *et al.*, 2015, p. 6)

Para determinar la diferencia entre los tratamientos se realizó en análisis de varianza de un factor (ANOVA), y se complementó con la comparación de medias utilizando la prueba de Tukey con un valor de significancia de  $p < 0.05$  e intervalos de confianza del 95% usando el software SPSS 15.0.1.

Todos los ensayos efectuados para determinar el valor del IC<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> se realizaron por triplicado para cada concentración de los compuestos. El análisis bioestadístico de datos se realizó mediante el uso del software GraphPad versión 6.0. con una diferencia significativa de  $p < 0.05$  e intervalos de confianza del 95%.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Efecto leishmanicida de los pirazoles en cultivos in vitro de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

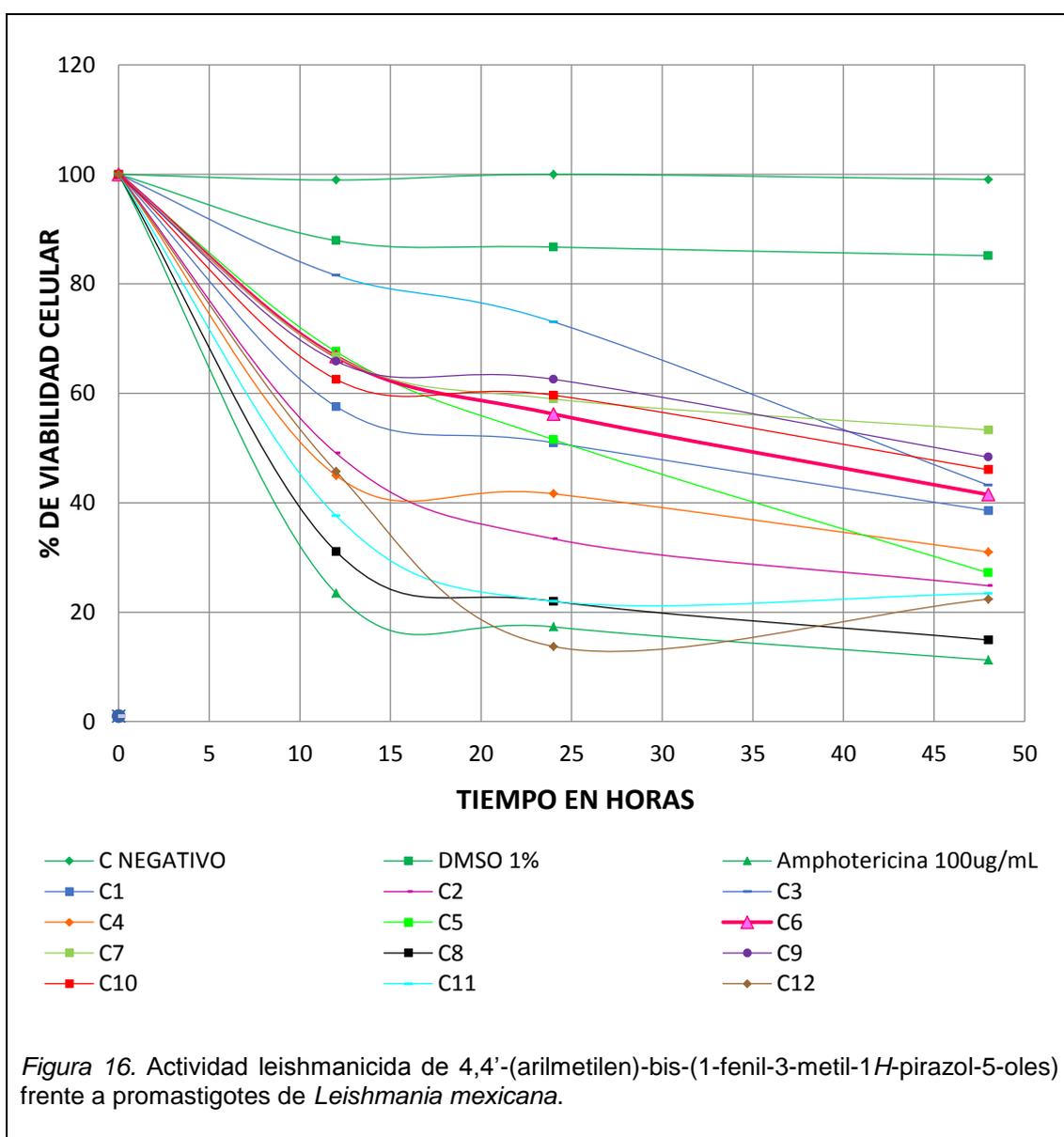
Para determinar el efecto leishmanicida de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles), se utilizó una serie de 12 compuestos sintetizados en el laboratorio que presentan diferentes sustituciones en el anillo aromático (Figura 15), y se efectuó el ensayo colorimétrico del bromuro de etidio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazolio (MTT) descrito en el punto 3.4, usando una concentración de 100µM de cada compuesto durante tres tiempos de incubación; 12, 24 y 48 horas.

El ensayo determinó que todos los pirazoles presentan actividad frente a promastigotes de *L. mexicana* conforme el tiempo de incubación aumenta, del cual se obtuvo los porcentajes de viabilidad de los parásitos que se muestran en la tabla 6 y la Figura 16

Tabla 6. Tiempo-Respuesta de 4,4'-(arilmetilen)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles) C1–C12 frente a promastigotes de *L. mexicana*.

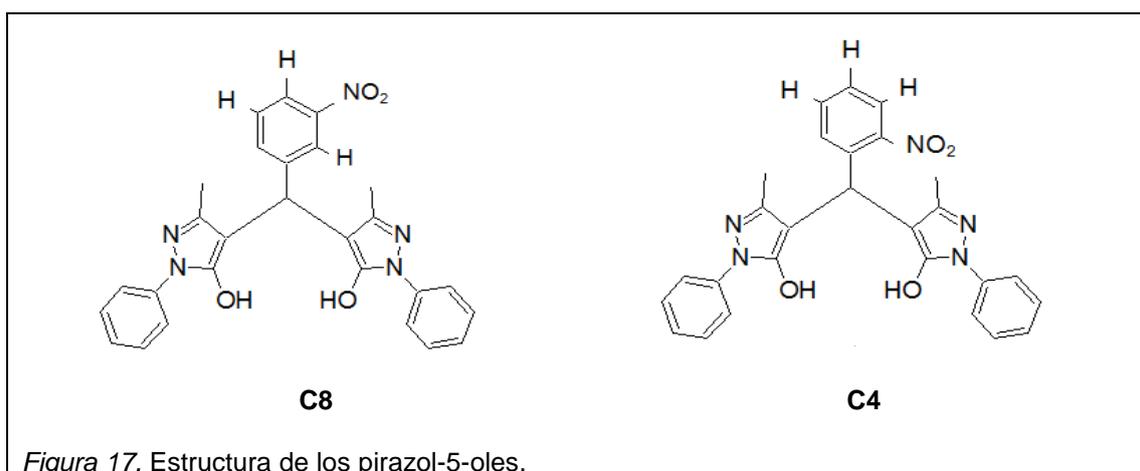
COMPUESTOS [100 µM]	% DE VIABILIDAD CELULAR		
	12 h	24 h	48 h
C1	57.5 ± 5,7	50.9 ± 2,9	38.5 ± 7,6
C2	49.0 ± 4,0	33.3 ± 7,1	24.8 ± 3,1
C3	81.5 ± 7,2	73.0 ± 2,1	43.2 ± 22,1
C4	44.9 ± 2,6	41.6 ± 5,5	30.9 ± 2,3
C5	67.5 ± 5,2	51.5 ± 10,0	27.1 ± 6,0
C6	66.7 ± 4,4	56.2 ± 2,5	41.4 ± 1,9
C7	66.6 ± 1,3	58.9 ± 6,4	53.3 ± 2,6
C8	31.0 ± 0,0	22.0 ± 2,3	14.9 ± 4,1
C9	65.8 ± 3,6	62.5 ± 0,0	48.3 ± 2,7
C10	62.5 ± 0,1	59.6 ± 8,3	46.0 ± 12,2
C11	37.6 ± 4,3	21.9 ± 13,3	23.4 ± 4,0
C12	45.7 ± 4,2	13.7 ± 1,3	22.3 ± 4,3
Anfotericina (100µg/mL)	23.4 ± 1,7	17.3 ± 1,9	11.2 ± 0,9
DMSO 1%	87.9 ± 1,6	86.7 ± 6,0	85.1 ± 9,9

Transcurrido las 12 y 24 horas de tratamiento los compuestos, **C2**, **C4**, **C8**, **C11** y **C12** presentaron actividad leishmanicida con un porcentaje de viabilidad en promastigotes menor al 50%, de igual forma, después de 48 horas todos los compuestos presentaron actividad menor a este valor a excepción de **C7** que presenta un 53.3%. En el caso de **C12** el porcentaje de viabilidad aumentó de 13,7% a las 24 horas a 22,3% a las 48 horas, esto podría sugerir que los parásitos que no mueren durante las primeras 24 horas de tratamiento recuperan su actividad metabólica, y por lo tanto se observa un aumento en el porcentaje.



Según los resultados obtenidos se observa que la presencia de sustituyentes

en el anillo aromático y su ubicación en cada compuesto tienen efecto en la actividad leishmanicida (Figura 16). En términos generales, los grupos electroaceptores aumentan más la actividad que los grupos electrodonadores, por ejemplo, el grupo nitro presente en **C8**, **C11**, y **C12**, genera un porcentaje de viabilidad de 14.9%, 22.4% y 11.2% respectivamente luego de 48 horas de tratamiento (Tabla 6), a diferencia de **C9** que al no tener ningún sustituyente su actividad es 3 veces menor. Si se analiza la posición del grupo nitro en el anillo se aprecia que cuando se encuentra en posición *meta* (**C8**), se tienen 2 veces mayor actividad que cuando está en *posición orto* (**C4**) (Figura 17), sin embargo, no se pudo evaluar la actividad en la posición *para* debido a no contar con el aldehído necesario para sintetizar el respectivo producto. Por otro lado, el efecto de los grupos electrodonadores es menor, excepto en **C2** que tienen dos grupos hidroxilos, y muestran el doble de la actividad observada en **C9**.



Para el análisis de varianza la hipótesis nula se planteó como  $H_0: C_1 = C_2 = C_{\dots k}$ , es decir las medias de los compuestos son iguales, y por el contrario la hipótesis alternativa es  $H_1: C_1 \neq C_2 \neq C_{\dots K}$  por lo menos uno de los compuestos difiere de los demás. El análisis de varianza de un factor demostró que las medias de los compuestos difieren de forma significativa en al menos uno de los niveles del factor tratamiento como se indica en la Tabla 7. Estos datos permiten aprobar la hipótesis alternativa, de que al menos una de las medias es diferente entre los tratamientos y que su forma de acción difiere según el tipo y ubicación del sustituyente que presenta cada compuesto.

Tabla 7. Análisis estadístico de la actividad leishmanicida de C1-C12 a diferentes tiempos mediante la prueba de ANOVA

Tiempo	F	P
12h	32,607	0,000
24h	22,383	0,000
48h	9,314	0,000

Nota: Para que se acepte la hipótesis nula  $P > 0.05$ . F = Relación de cuadrados medios, P = significancia

Para determinar si los compuestos presentan una actividad similar a la que muestra la Anfotericina, medicamento utilizado como control positivo y que además es utilizado actualmente en el tratamiento de la leishmaniasis (Mohapatra, 2014, pp. 4-9), se realizó el análisis de comparación de medias mediante la prueba de Tukey, la cual mostró que para un valor de  $p > 0,05$  el compuesto **C8** es similar al control positivo a las 12h, mientras que a las 24h se suman **C2**, **C11** y **C12** y a las 48h a más de los anteriores, **C4** y **C5**. Es decir que de los 12 compuestos 6 muestran una actividad similar a la que presenta la Anfotericina (Tabla 8)

Tabla 8. Análisis de Tukey de las medias de los compuestos C1-C12 obtenidas en promastigotes de *L. mexicana*

TRATAMIENTOS	12H		24H		48H		P
	DIFERENCIA DE MEDIAS	P	DIFERENCIA DE MEDIAS	P	DIFERENCIA DE MEDIAS	P	
<b>CONTROL PARÁSITOS</b>	-76,2	0	-82,8	0	-92,1	0	
<b>DMSO 1%</b>	-65,1	0	-68,9	0	-83,0	0	
<b>C1</b>	-29,6	0	-33,8	0	-27,5	0,003	
<b>C2</b>	-25,7	0	-16,2	0,108*	-13,5	0,603*	
<b>C3</b>	-58,0	0	-55,9	0	-38,9	0	
<b>C4</b>	-21,5	0	-24,5	0,002	-18,0	0,276*	
<b>C5</b>	-45,1	0	-33,1	0	-15,3	0,405*	
<b>C6</b>	-43,0	0	-39,2	0	-26,3	0,005	
<b>C7</b>	-45,1	0	-41,9	0	-36,7	0	
<b>C8</b>	-6,7	0,826*	-4,8	0,999*	-2,1	1,000*	
<b>C9</b>	-45,7	0	-38,3	0	-31,3	0	
<b>C10</b>	-41,7	0	-44,0	0	-36,2	0	
<b>C11</b>	-13,3	0,037	-4,9	0,999*	-11,1	0,850*	
<b>C12</b>	-20,8	0,001	-4,0	1,000*	-10,6	0,886*	

Nota: Se realizó la comparación de medias obtenidas a las 12H, 24h y 48H en base al control positivo Anfotericina, \*  $P > 0.05$ . El (\*) indica que la acción del compuesto es similar a la Anfotericina

#### 4.2. Determinación de la IC<sub>50</sub> de los compuestos bioactivos frente a promastigotes de *Leishmania mexicana*.

Se seleccionaron los dos compuestos que presentan la mejor actividad a las 48 horas de tratamiento (**C8** y **C12**), y debido a que en su mayoría se observó que los compuestos presentan el mismo comportamiento en el tiempo, se decidió realizar la evaluación de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) a las 24 horas.

En la tabla 9 están reportados los porcentajes de viabilidad a las diferentes concentraciones de los compuestos analizados. Se determinó el valor del IC<sub>50</sub> mediante el uso del programa GraphPad versión 6.0, para **C8** el valor es de 33,35  $\mu\text{M} \pm 11.1$ , (Figura 18), y para **C12** es de 89,37  $\mu\text{M} \pm 15.1$ , (Figura 19) esto quiere decir que, las concentraciones calculadas para ambos compuestos inhiben el 50% de promastigotes.

Tabla 9. Porcentaje de viabilidad de C8 y C12 a distintas concentraciones.

Diluciones [ $\mu\text{M}$ ]	C8	C12
	Viabilidad (%)	Viabilidad (%)
300	17.7 $\pm$ 2.1	18.1 $\pm$ 4.3
150	18.8 $\pm$ 3.1	29.5 $\pm$ 8.8
75	27.0 $\pm$ 9.0	59.1 $\pm$ 8.8
37.5	47.3 $\pm$ 8.9	81.4 $\pm$ 2.9
18.75	70.5 $\pm$ 7.0	85.0 $\pm$ 1.9
9.37	82.7 $\pm$ 4.9	86.3 $\pm$ 2.3
4.68	85.1 $\pm$ 6.3	84.4 $\pm$ 3.0

Pese a no tener un IC<sub>50</sub> tan bajo como los que presentan la pentamidina (1.97  $\mu\text{M}$ ) (Martín *et al.*, 2009, pp. 463-467) y la anfotericina (0.1  $\mu\text{M}$ ) (Montenegro *et al.*, 2003) son mucho más bajos que los reportados para el pentostam de 991.69  $\mu\text{M}$  (Abbas y Zghair, 2015, p. 1348) y glucantime de 171.911 mM (Treiger, Osso, de Andrade y do Nascimento, 2013, pp. 623-630), los cuales son medicamentos de primera línea usados en el tratamiento anti-Leishmania y que además presentan efectos secundarios de toxicidad (Mohapatra, 2014, pp. 4-9). De modo que es de gran importancia realizar estudios in vivo de estos

pirazoles que comparen su eficacia y toxicidad controlando variables en un modelo animal en comparación a los medicamentos anti- *Leishmania* que se utilizan actualmente en el tratamiento.

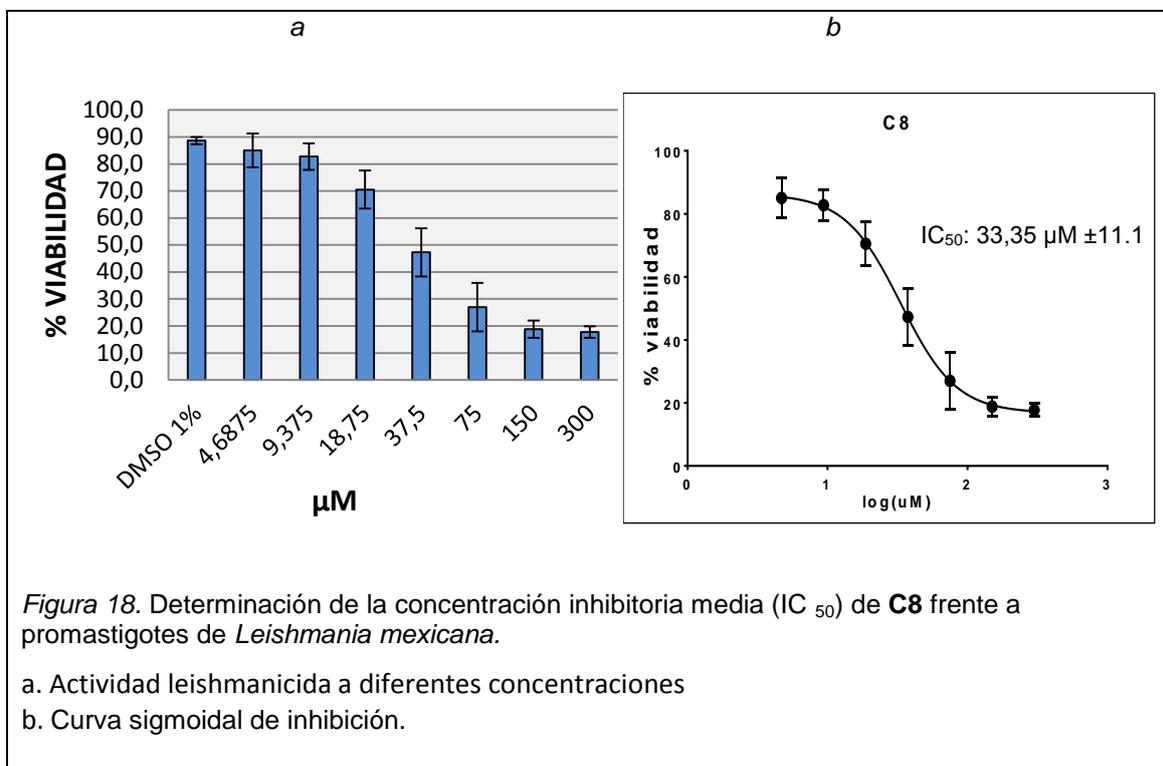


Figura 18. Determinación de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) de **C8** frente a promastigotes de *Leishmania mexicana*.

- Actividad leishmanicida a diferentes concentraciones
- Curva sigmoideal de inhibición.

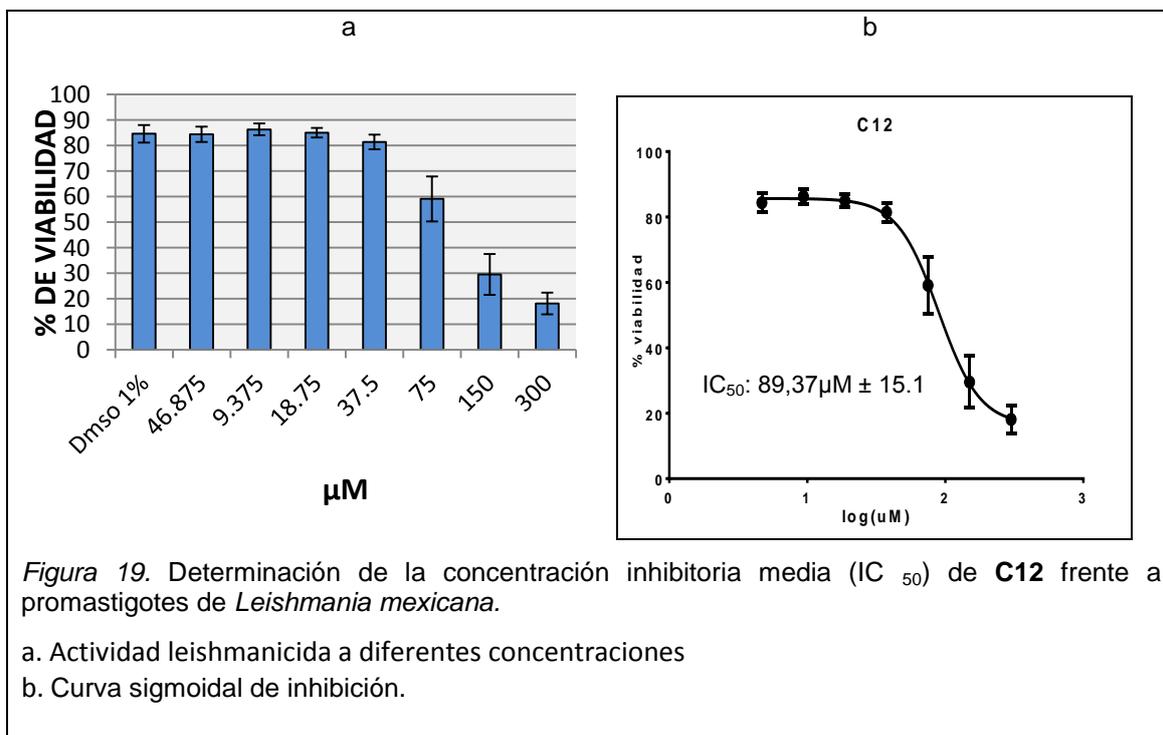


Figura 19. Determinación de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) de **C12** frente a promastigotes de *Leishmania mexicana*.

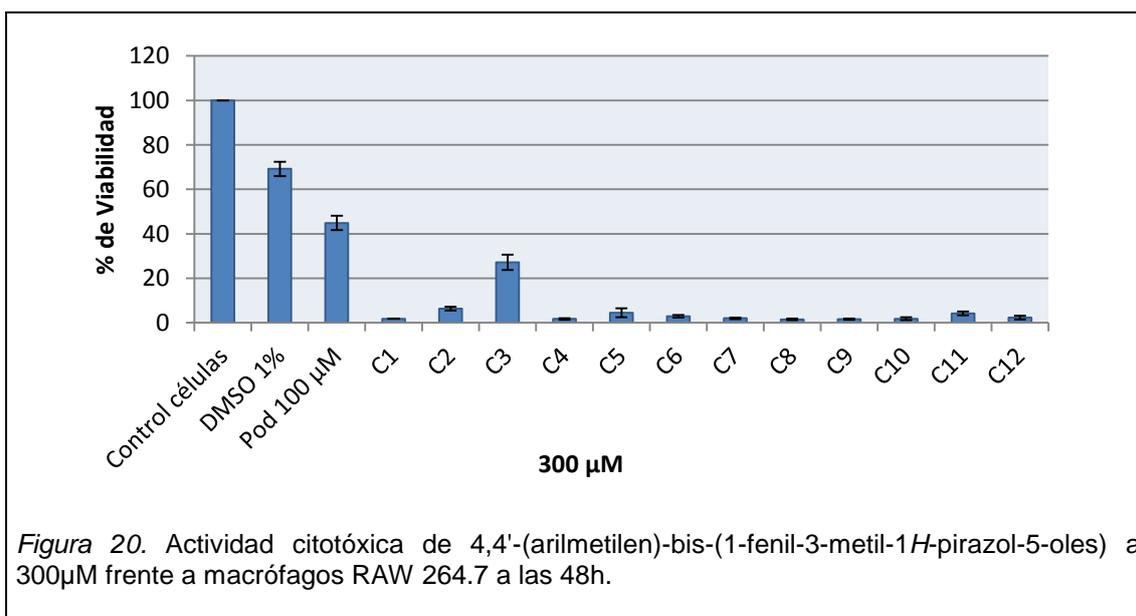
- Actividad leishmanicida a diferentes concentraciones
- Curva sigmoideal de inhibición.

#### 4.3. Efecto citotóxico de los pirazoles en cultivos in vitro de macrófagos RAW 264.7

La investigación in vitro de la actividad leishmanicida de un compuesto requiere conocer previamente su nivel citotóxico en líneas celulares. De esta forma, conociendo la concentración máxima del compuesto que no altere el metabolismo o la morfología de las líneas celulares, es posible implementar cualquier otro tipo de ensayo que requiera la utilización del compuesto sin que interfiera en los resultados de estudios posteriores (Jiang y Kopp-Schneider, 2014, p.493).

En este experimento se probó la citotoxicidad de los compuestos a una concentración 3 veces más alta que la utilizada en los promastigotes, es decir 300µM. Al igual que en la evaluación de la actividad frente a los parásitos, para determinar el efecto citotóxico de los 12 pirazoles se realizó el ensayo colorimétrico (MTT) tal como está descrito en el punto 3.7, con lo cual se obtuvo el porcentaje de viabilidad de macrófagos RAW 264.7 a las 48h de incubación.

Según los resultados obtenidos de la media de tres experimentos diferentes se determinó que todos los pirazoles son altamente tóxicos a 300 µM (Figura 20).



De los cuales el compuesto **C2** y **C3** presentan menor toxicidad con un porcentaje de viabilidad de 27.14% y 6,38 % respectivamente. La estructura del compuesto **C3** presenta un grupo electrodonador, el NMe<sub>2</sub>, en posición *para*, mientras que **C2** presenta dos hidroxilos en posiciones *meta* y *para*, en consecuencia, los grupos electrodonadores tienen menor efecto en la toxicidad que los grupos electroaceptores.

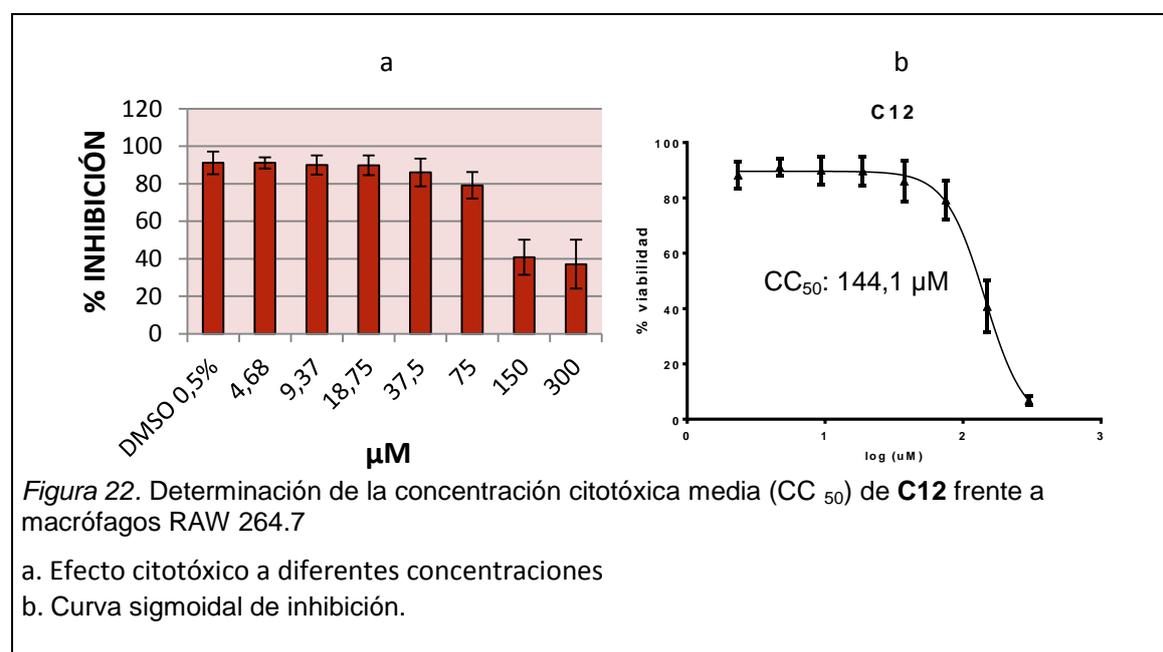
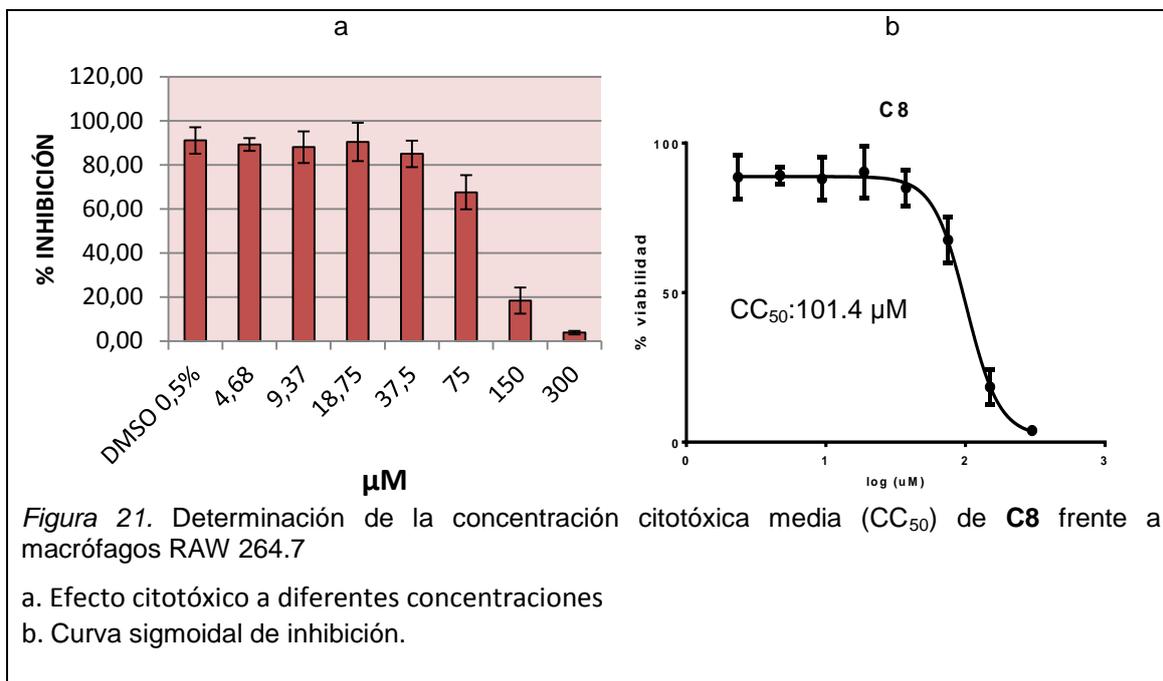
No obstante, pese a la alta citotoxicidad observada a esta concentración, es necesario determinar la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>), definida como la concentración del compuesto que mata la mitad de las células con respecto a un control sin tratamiento (Jiang y Kopp-Schneider, 2014, p. 493), con el fin de valorar el índice de selectividad (IS) de los pirazoles estudiados en esta investigación. El índice de selectividad se calcula mediante la relación entre CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> y cuando este es mayor a 10 se considera que una sustancia presenta una actividad leishmanicida prometedora (Cardona, 2006, p. 33).

#### **4.4. Determinación de la CC<sub>50</sub> de los compuestos bioactivos frente a macrófagos RAW 264.7**

Se procedió a determinar el CC<sub>50</sub> de los compuestos bioactivos en promastigotes **C8** y **C12** con el fin de calcular sus respectivos IS, para ello, se utilizó el método colorimétrico del MTT, realizando un ensayo de dosis-respuesta en macrófagos RAW 264.7 a las mismas concentraciones utilizadas para el cálculo del IC<sub>50</sub> en promastigotes. Con el uso del software GraphPad versión 6.0 se obtuvo el valor de CC<sub>50</sub> para **C8** de 101,4 µM (Figura 21), y para **C12** de 144,1 µM (Figura 22).

Los datos obtenidos muestran que el IS para **C8** es de 3.0, lo que significa que la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>) de **C8** en macrófagos es tres veces mayor que la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) en los promastigotes (33,35µM). De la misma forma, del análisis de **C12** se observa que el IS es de 1.6, es decir que el valor del CC<sub>50</sub> (144,1 µM) es 1.6 veces mayor que el IC<sub>50</sub>

(89,37 $\mu$ M), un valor que representa la mitad obtenida para el caso de **C8**.



De lo antes mencionado, se considera que una sustancia presenta una actividad leishmanicida prometedora cuando tiene un IS mayor a 10 (Cardona, 2006, p. 33), sin embargo existen algunos medicamentos que se encuentran

actualmente disponibles en el mercado con IS's menores como la ciclosporina, digoxina y teofilina (Chou *et al.*, 2015, p. 1237), además el uso de sistemas que permitan introducir directamente la droga en el sitio de acción permitiría mejorar los perfiles de toxicidad, mejorando de esta manera los índices de selectividad (das Neves, Nunes, Rodriguez y Samento, 2016, pp. 57–75). Por ejemplo, el uso de nanocarriers con el antiviral mellitin muestran un aumento en 19 veces el valor del  $CC_{50}$  frente a células VK2/E6E7 (Jallouk *et al.*, 2014, pp. 1-7). Por lo que, aplicando carriers que permitan aumentar el índice de selectividad los compuestos podrían ser más efectivos en el tratamiento de la leishmaniasis.

Por otra parte, en comparación a la citotoxicidad que presentan algunos medicamentos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis frente a macrófagos RAW 264.7, la anfotericina tiene un  $CC_{50}$  de 33.97  $\mu$ M (Ríos y Otero, 2008, pp. 200-211) y la pentamidina un  $CC_{50}$  de 25.5 $\mu$ M (Faria *et al.*, 2013, pp. 6310–6312). Si se comparan estos valores con los obtenidos para **C8** y **C12** se observa que estos últimos presentan concentraciones más elevadas, lo que indica que ambos compuestos presentan menor toxicidad frente a esta línea celular. Sin embargo varios autores reportan valores diferentes de  $CC_{50}$  de estas drogas, por ejemplo, Chouhan, Islamuddin, Ahmad, Sahal, y Afrin (2014, p. 232) mencionan que el  $CC_{50}$  de la pentamidina es de 132.78 $\mu$ M, lo que implica que, en este caso, **C8** es más tóxico que la droga, pero **C12** aún sigue siendo menos tóxico.

En consecuencia el índice de selectividad de **C8** y **C12** no es tan óptimo como se quisiera para ser utilizado como fármaco, pero se podrían utilizar en un futuro con posteriores investigaciones enfocadas en mejorar los niveles de citotoxicidad, ya sea modificando el tipo y ubicación del sustituyente en el anillo estructura o aplicando carriers que permitan reducir el  $IC_{50}$  y aumentar el  $CC_{50}$  para que puedan ser más efectivos en el tratamiento de la leishmaniasis.

#### 4.5. Análisis del cambio de potencial de membrana en promastigotes *Leishmania mexicana*.

El mecanismo de acción de uno de los medicamentos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis, anfotericina, está relacionado con el daño del potencial de membrana, el cual se origina por la afinidad que posee a los enlaces de esteroides incorporados en la membrana, provocando su despolarización y la formación de poros acuosos que aumentan la permeabilidad de protones y cationes monovalentes (Kaur y Rajput, 2014, p. 2-4). Por lo que, para determinar un posible modo de acción de los compuestos bioactivos **C8** y **C12** se utilizó el colorante fluorescente DiBAC<sub>4</sub>(3), que permite observar cambios en el potencial de membrana debido a su alto grado de sensibilidad de tensión, permitiéndole ingresar en las células despolarizadas donde se une a la membrana o a las proteínas intracelulares emitiendo una fluorescencia verde (Plock *et al.*, 2001, 141-152). Para el ensayo se utilizó dos concentraciones diferentes obtenidas en el cálculo del IC<sub>50</sub>, es decir, una concentración alta y una concentración media en comparación con el cultivo sin tratar y el cultivo tratado con digitonina, usada como control positivo.

Los datos obtenidos revelan que **C8** a 150 µM produce un daño del potencial de membrana en los promastigotes, el cual no es tan fuerte como el observado con la digitonina, pero a 34 µM no se evidencia daño (Figura 23), lo que sugiere que el mecanismo principal de acción frente a los parásitos no involucra el daño del potencial de membrana, sino más bien algún otro mecanismo el cual debería ser analizado con mayor detenimiento. Al contrario, en **C12** a ninguna de las dos concentraciones usadas (300 µM y 90 µM) se observa un daño del potencial de membrana (Figura 24), esto quiere decir que su mecanismo de acción es diferente y no se descarta que tanto **C8** como **C12** compartan un mecanismo de acción en común, lo que no es de extrañar debido a su similitud estructural.

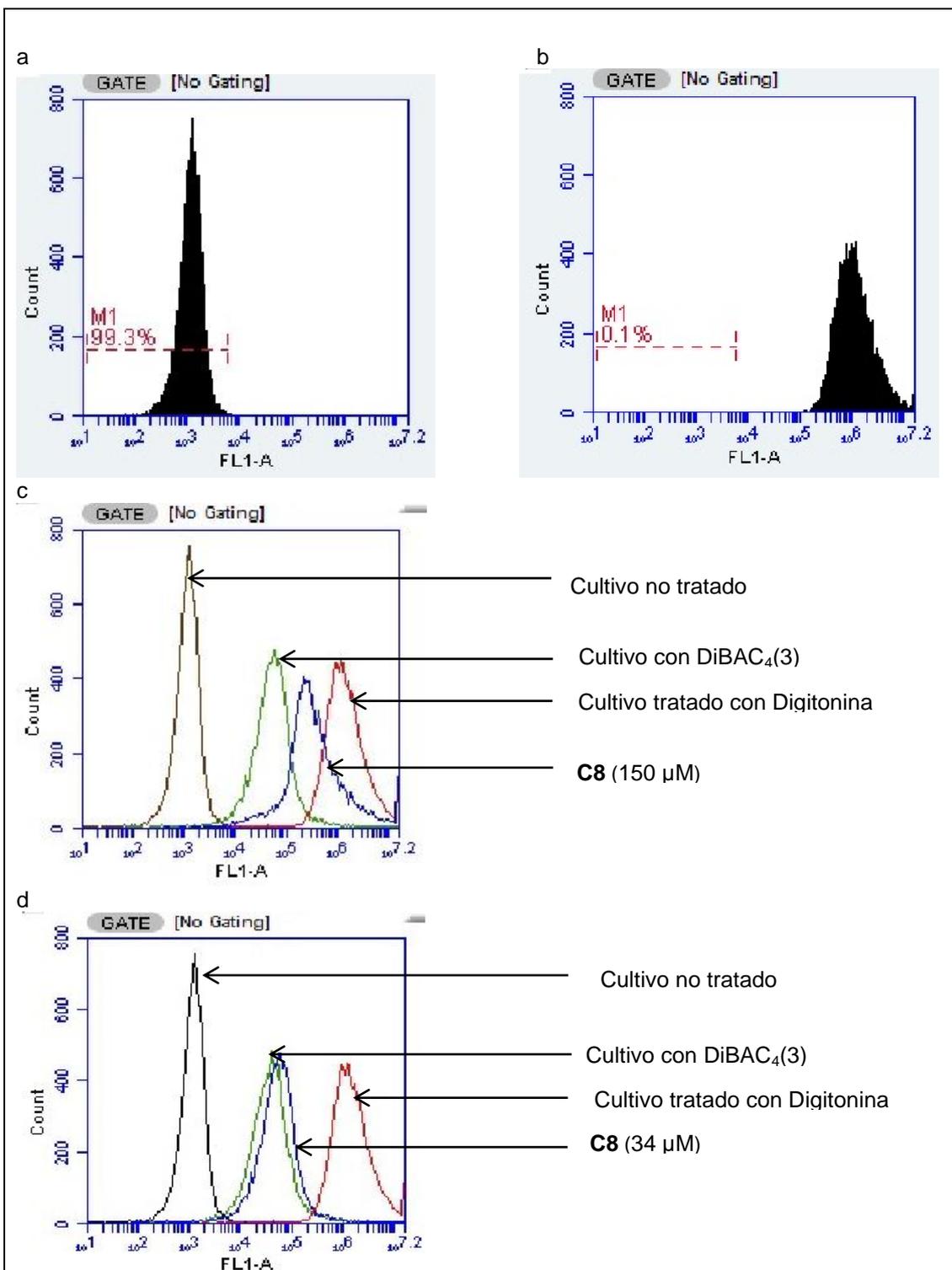
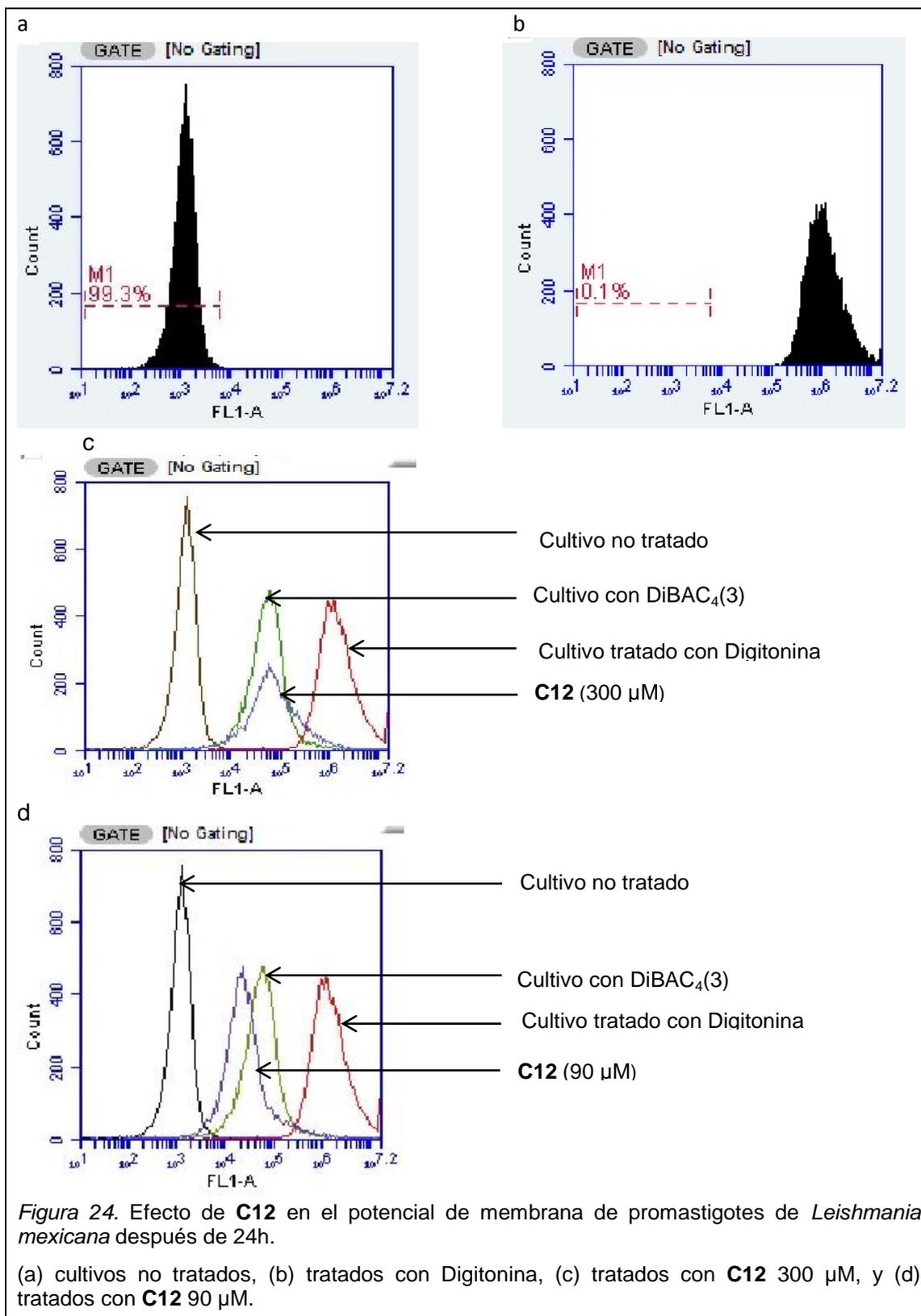


Figura 23. Efecto de **C8** en el potencial de membrana de promastigotes de *Leishmania mexicana* después de 24h.

(a) cultivos no tratados, (b) tratados con Digitonina, (c) tratados con **C8** 150 μM, y (d) tratados con **C8** 34 μM.



## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

Todos los 4,4'-(arilmetileno)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles) **C1-C12** poseen actividad leishmanicida frente a promastigotes de *Leishmania mexicana* a una concentración 100  $\mu$ M, siendo **C8** y **C12** los que mostraron la mayor actividad.

El análisis de la estructura-actividad muestra que la presencia del grupo nitro es importante para la actividad observada y cuando este grupo se encuentra en posición *meta*, esta es mayor, sin embargo no se puede descartar que este grupo en posición *para* también tenga algún efecto, por lo que es necesario sintetizar este producto para poder evaluarlo.

Todos los 4,4'-(arilmetileno)-bis-(1-fenil-3-metil-1*H*-pirazol-5-oles) **C1-C12** evaluados mostraron toxicidad a una concentración de 300  $\mu$ M frente a macrófagos RAW 264.7, de los cuales **C8** posee menor toxicidad que **C12**, con  $CC_{50}$  superiores a los reportados para la pentamidina y anfotericina.

El compuesto **C8** genera un daño en el potencial de membrana en promastigotes a una concentración de 150  $\mu$ M, pero no a la concentración del  $IC_{50}$  (34  $\mu$ M), pero considerando que el daño no muestra los niveles observados en el control positivo, no se descarta que otros mecanismos también sean los responsables de la actividad.

El mecanismo de acción de **C12** no involucra un daño al potencial de la membrana del parásito porque incluso a una concentración 3 veces más alta que la del  $IC_{50}$  no se observó ningún indicio de este efecto en los promastigotes.

## CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

Aunque en la presente investigación se demuestra que los compuestos presentan actividad leishmanicida en promastigotes, se recomienda evaluar el efecto de los compuestos en amastigotes axénicos e intracelulares.

Asimismo se debe realizar estudios en modelos *in vivo* para tener mayor información sobre la actividad y toxicidad de estos compuestos.

Calcular los valores del  $IC_{50}$  y  $CC_{50}$  de los compuestos restantes.

Explorar diferentes mecanismos de reacción para determinar con mayor exactitud el modo de acción de estos compuestos.

En posteriores investigaciones se debe poner énfasis en un análisis de estructura- actividad más amplio, para tener mayor información sobre el efecto de los sustituyentes en la estructura que permitan mejorar los valores de  $IC_{50}$  y  $CC_{50}$  obtenidos en este estudio.

## REFERENCIAS

- Adams, E., Jacquet, D., Schoone, G., Gidwani, K. y Boelaert, M. (2012) Leishmaniasis Direct Agglutination Test: Using Pictorials as Training Materials to Reduce Inter-Reader Variability and Improve Accuracy. *Plos Neglectec Tropical Diseases*. 6(12), 1-2. doi:10.1371/journal.pntd.0001946
- Abbas, Z. y Zghair, K. (2015) Efficacy of Amphotericine B drug Against Promastigote and Axenic Amastigote of *Leishmania tropica* in Vitro. *Iraqi Journal of Science*. 56(2B), 1343-1349.
- Alvar, J., Vélez, D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., y Cano, J. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One*. 7(5), 1-12. doi:10.1371/journal.pone.0035671
- Bañuls, A., Jonquieres, R., Guerrini, F., Pont, F., Barrera, C., Espinel, I. y Tibayrenc, M. (1999) Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador: Are *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* distinct taxa. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 61(5), 838–845.
- Bilbao, P. (2014). *Caracterización molecular y evaluación de la susceptibilidad de especies de Leishmania, circulantes en Bolivia, a nuevos fármacos y formulaciones*. Recuperado el 26 de mayo del 2016 de <http://tesisenred.net/handle/10803/356693>
- Boelaert, M. y Sundar, S. (2014). Leishmaniasis. En Farrar, J. Manson's Tropical Diseases (pp. 631-651). China.
- Calvopiña, M., Loor, R., Lara, F., Zambrano, P. y Hasiguchi, Y. (2012) Prevalencia y formas clínicas de Leishmaniasis en el noroccidente de la Provincia de Pichincha - Ecuador. *Revista Facultad Ciencias Médicas*. 37, 31-38.
- Canese, A., Domingo, J., Oddone, R. (2011). *Manual de Diagnóstico de Tratamiento de las Leishmaniosis*. Asunción. Recuperado el 28 de mayo del 2016 de <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/10102>
- Cardona, D. (2006). *Moléculas bioactivas contra Leishmania (Viannia) panamensis. Actividad y optimización molecular*. Recuperado el 24 de

- julio del 2016 de <http://tesis.udea.edu.co/dspace/handle/10495/306>
- Centro de Control y Prevención de Enfermedades. (2015). *Parasites – Leishmaniasis Biology*. Recuperado el 20 de mayo del 2016 de <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
- Chena, L., Nara, E., Canese, A., Oddone, R. y Russomando, G. (2013) Aplicación de la PCR para la detección de género y complejos de *Leishmania* en diferentes tipos de muestras biológicas. *Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*. 11(1), 45-51.
- Chou, Ch., Hsu, Ch., Chou, Ch., Chen, T., Chou, L., y Chou, Y. (2015) Tablet splitting of narrow therapeutic index drugs: a nationwide survey in Taiwan. *International Journal of Clinical Pharmacy*. 37(6), 1235-1241. doi:10.1007/s11096-015-0194-0
- Chouhan, G., Islamuddin, M., Ahmad, F., Sahal, D. y Afrin, F. (2014) Antileishmanial Potential of Piper nigrum Seed Extracts against *Leishmania donovani*. *Open Journal of Medical Microbiology*. 4, 228–235. doi: 10.4236/ojmm.2014.44025
- Corral, M. (2015). *Antileishmanial activity of Allicin: mechanism of action, "in vivo" efficacy and value in combined therapy with Amphotericin B*. Recuperado el 21 de junio del 2016 de <http://eprints.sim.ucm.es/31174/>
- Croft, S. y Olliaro, P. (2011) Leishmaniasis chemotherapy challenges and opportunities. *Clinical Microbiology and Infection*. 17, 1478–1483. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03630.x
- David, C., y Craft, N. (2009) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*. 22, 491–502.
- das Neves, J., Nunes, R., Rodrigues, F. y Sarmiento, B. (2016) Nanomedicine in the development of anti-HIV microbicides. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 103, 57–75. doi:10.1016/j.addr.2016.01.017
- Dawit, G., Girma, Z. y Simenew K. (2013) A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *Bacteriology & Parasitology*. 41-47. doi:10.4172/2155-9597.1000166
- De Vries, H., Reedijk, S. y Shalig, H. (2015) Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *American Journal of Clinical Dermatology*. 16, 99–109. doi:10.1007/s40257-015-0114-z

- Domiaty, S., El-Mallah, A., Ghoneim, A., Bekhit, A. y El-Razik, A. (2016) Evaluation of anti-inflammatory, analgesic activities, and side effects of some pyrazole derivatives. *Inflammopharmacology*. doi:10.1007/s10787-016-0270-7
- Dutta, A., Bandyopadhyay, S., Mandal, C. y Chatterjee, M. (2005) Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology International*. 54(2), 119–122. doi:10.1016/j.parint.2005.01.001
- Ezatpour, B., Saedi Dezaki, E., Mahmoudvand, H., Azadpour, M. y Ezzatkhan, F. (2015) In Vitro and In Vivo Antileishmanial Effects of Pistacia khinjuk against *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. *Hindawi Publishing Corporation*. 1-6. doi:10.1155/2015/149707
- Faria, J., Dos Santos, M., Bernardino, A., Becker, K., Machado, G., Rodrigues, R. y Leon, L. (2013) Synthesis and activity of novel tetrazole compounds and their pyrazole-4-carbonitrile precursors against *Leishmania* spp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 23(23), 6310–6312. doi:10.1016/j.bmcl.2013.09.062
- Fiebig, M., Kelly, S. y Gluenz, E. (2015) Comparative Life Cycle Transcriptomics Revises *Leishmania mexicana* Genome Annotation and Links a Chromosome Duplication with Parasitism of Vertebrates. *Plos Pathogens*. 11(10), 1-28. doi:10.1371/journal.ppat.1005186
- Freitas, L., Chatelain, E., Andrade, H. y Siqueira, J. (2012) Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2, 11-19. doi:10.1016/j.ijpddr.2012.01.003
- Frezard, F., Demicheli, C. y Ribeiro, R. (2009) Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules*. 14, 2317-2336. doi:10.3390/molecules14072317
- Ganfou, H., Bero, J., Tchinda, A., Gbaguidi, F., Gbenou, J., Moudachirou, M., Frédéric, M. y Quetin-Leclercq, J. (2012) Antiparasitic activities of two sesquiterpenic lactones isolated from *Acanthospermum hispidum* D.C. *Journal of Ethnopharmacology*. 141, 411–417. doi:10.1016/j.jep.2012.03.002

- Gehrke, S. (2012). *Small Molecules with Anti-trypanosomal and Anti-leishmanial Activity*. Recuperado el 26 de mayo del 2016 de <http://core.ac.uk/download/pdf/19086582.pdf>
- Gomes, C., Oliveira, O., Roselino, A., De Paula, N., Soares, K. y Ribeiro, R. (2014) Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 89(5), 701-711. doi:10.1590/abd1806-4841.20142389
- Gomtsyan, A. (2012) Heterocycles in drugs and drug discovery. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 48(1), 7–10. doi: 10.1007/s10593-012-0960-z
- Gouda, M. (2016) Chemistry of 4,4'-(arylmethylene)-bis (3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-ol)s. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 53(2), 356–376.
- Graziose, R., Rojas, P., Rathinasabapathy, T., Dekock, C., Grace, M., Poulev, A., Lila, M., Smith, P. y Raskin, I. (2012) Antiparasitic compounds from *Cornus florida L.* with activities against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania tarentolae*. *Journal of Ethnopharmacology*. 142, 456-461. doi:10.1016/j.jep.2012.05.017
- Gupta, P., Gupta., J y Halve, A. (2015) Synthesis and Biological significance of pyrazolones: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 6(6), 2291-2310. doi:10.3040/IJPSR.0975-8232
- Gupta, P., Kumar, J., Bansal, S. y Halve, A. (2015) Synthesis and in-vitro antimicrobial studies of some new pyrazolones. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 7(1), 25-29.
- Hartley, M., Drexler, S., Ronet, C., Beverley, S. y Fasel, N. (2014). The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. *National Institute of Health*. 30(8), 412–422. doi:10.1016/j.pt.2014.05.006.
- Hasaninejed, A., Kazerooni, M. y Zare, A. (2013) Room-Temperature, Catalyst-Free, One-Pot Pseudo-Five-Component Synthesis of 4,4-(Arylmethylene) bis (3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-ol)s under Ultrasonic Irradiation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 1(6), 679–684. doi:10.1021/sc400081c
- Hernández, C., Carbajo, E., Sojo, F., Arvelo, F., Kouznetsov, V., Romero, A. y Romero, J. (2015) In vitro activity of synthetic tetrahydroindeno[2,1-

- c]quinolines on *Leishmania mexicana*. *Parasitology International*. 1-20.  
doi:10.1016/j.parint.2015.06.011
- Hodiamont, C., Kager, P., Bart, A., De Vries, H., Van Thiel, P., Leenstra, T., De Vries, P., Van Vugt, M., Grobusch, M. y Van Gool, T. (2014) Species-Directed Therapy for Leishmaniasis in Returning Travellers: A Comprehensive Guide. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 8(5), 1-16.  
doi:10.1371/journal.pntd.0002832
- Jallouk, A., Moley, K., Omurtag, K., Lanza, G., Wickline, S. y Hood, L. (2014) Nanoparticle incorporation of melittin reduces sperm and vaginal epithelium cytotoxicity. *Plos One*. 9(4), 1-7.  
doi:10.1371/journal.pone.0095411
- Jiang, X. y Kopp-Schneider, A. (2014) Summarizing EC50 estimates from multiple dose-response experiments: A comparison of a meta-analysis strategy to a mixed-effects model approach. *Biometrical Journal*. 56(3), 493–512. doi:10.1002/bimj.201300123
- Kaur, G. y Rajput, B. (2014) Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in *Leishmania*. *Journal of Parasitology Research*. 1-11.  
doi:10.1155/2014/726328
- Lemrani, M., Hamdi, S., Laamrani, A. y Hassar, M. (2009) PCR detection of *Leishmania* in skin biopsies. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 3(2), 115-122. doi:10.3855/jidc.511
- Mahmoudvand, H., Ezzatkhah, F., Sharififar, F., Sharifi, I. y Saedi Dezaki, E. (2015) Antileishmanial and Cytotoxic Effects of Essential Oil and Methanolic Extract of *Myrtus communis* L. *Korean Society for Parasitology and Tropical Medicine*. 53(1), 21-27.  
doi:10.3347/kjp.2015.53.1.21
- Martín, Z., Moo, R., González, F., Chan, M., Torres-Tapia, L. y Peraza, S. (2009) In vitro activity of *Tridax procumbens* against promastigotes of *Leishmania mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology*. 122(3), 463–467.  
doi:10.1016/j.jep.2009.01.037
- Ministerio de Salud Pública. (2016). *Gaceta Epidemiológica Semanal. Semana Epidemiológica N 53*. Quito. Recuperado el 20 de mayo del 2016 de

- <http://www.salud.gob.ec/gaceta-epidemiologica-ecuador-sive-alerta/>  
Ministerio de Salud Pública. (2013). *Manual de procedimientos del Subsistema alerta acción*. (2.<sup>a</sup> ed). Quito. Recuperado el 20 de mayo del 2016 de [https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/manual\\_de\\_procedimientos\\_sive-alerta.pdf](https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/manual_de_procedimientos_sive-alerta.pdf)
- Mishra, B. B., Kishore, N., Singh, R. K., & Tiwari, V. K. (2013). Scope of Alkaloids in Antileishmanial Drug Discovery and Development. En Ramawat, K. (Ed) *Natural Products* (pp. 1263-1299). Springer Berlin Heidelberg.
- Mohapatra, S. (2014) Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Tropical Parasitology*. 4(1), 4-9. doi:10.4103/2229-5070.129142.
- Montalvo, A. (2011). *Tipificación de las especies de Leishmania de importancia médica basada en el gen que codifica la proteína HSP70 citoplasmática*. Recuperado el 30 de mayo del 2016 de <http://tesis.repo.sld.cu/305/>
- Montealegre, I. (2010) Importancia de los medios de cultivo en el diagnóstico de leishmaniasis. *NOVA*. 8(14) 128 – 132.
- Montenegro, H., Gutiérrez, M., Romero, L., Ortega-Barría, E., Capson, T. y Rios, L. (2003) Aporphine alkaloids from *Guatteria* spp. with leishmanicidal activity. *Planta Medica*. 69(7), 677–679. doi:10.1055/s-2003-41126
- Niknam, K. y Mirzaee, S. (2011) Silica Sulfuric Acid, an Efficient and Recyclable Solid Acid Catalyst for the Synthesis of 4, 4'-(Arylmethylene) bis (1 *H*-pyrazol-5-ols). *Synthetic Communications*. 41(16), 2403–2413. doi:10.1080/00397911.2010.502999
- Oliveira, L., Schubach, A., Martins, M., Passos, S., Oliveira, R., Marzochi, M. y Andrade, C. (2011) Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica*. 118, 87-96. doi:10.1016/j.actatropica.2011.02.007
- Organización Mundial de la Salud. (2010). *Control de las Leishmaniasis*. Recuperado el 10 de mayo del 2016 de [www.who.int/iris/bitstream/10665/82766/1/WHO\\_TRS\\_949\\_spa.pdf](http://www.who.int/iris/bitstream/10665/82766/1/WHO_TRS_949_spa.pdf)
- Organización Mundial de la Salud. (2015). *Leishmaniasis*. Recuperado el 10 de mayo de 2016 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>

- Plock, A., Sokolowska-Kohler, W. y Presber, W. (2001) Application of Flow Cytometry and Microscopical Methods to Characterize the Effect of Herbal Drugs on *Leishmania Spp.* *Experimental Parasitology*. 97, 141–153. doi:10.1006/expr.2001.4598
- Quent, V., Loessner, D., Friis, T., Reichert, J. y Hutmacher, D. (2010) Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 14(4), 1003-1013. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01013.x
- Revez, L., Maia-Elkhoury, A., Nicholls, R., Sierra, G. y Yadon, Z. (2013) Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. *Plos One*. 8(4), 1-14. doi:10.1371/journal.pone.0061843
- Ríos, Y. y Otero, A. (2008) Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. 37(2), 200–211.
- Riss, T., Moravec, R., Niles, A., Benink, H., Worzella, T. y Minor, L. (2015). *Assay Guidance Manual Cell Viability Assays*. Recuperado el 29 de junio de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Sadeghian, G., Ziaei, H., Bidabadi, L. y Ali Nilforoushzadeh, M. (2013) Evaluation of Leishmanin Skin Test Reaction in Different Variants of Cutaneous Leishmaniasis. *Indian Journal of Dermatology*. 58(3), 239. doi:10.4103/0019-5154.110838
- Sáenz, O. (2010). *Agentes antiparasitarios de plantas de la Amazonia Peruana empleadas en medicina tradicional* (Tesis doctoral). Recuperado el 26 de mayo del 2016 de [https://dialnet.unirioja.es/institucion/uam/buscar/tesis?querysDismax.DOCUMENTAL\\_TODO=Agentes+antiparasitarios+de+plantas+de+la+Amazonia+Peruana+empleadas+en+medicina+tradicional](https://dialnet.unirioja.es/institucion/uam/buscar/tesis?querysDismax.DOCUMENTAL_TODO=Agentes+antiparasitarios+de+plantas+de+la+Amazonia+Peruana+empleadas+en+medicina+tradicional)
- Sainz, O. (2013). *Leishmaniasis transmission biology: Role of Promastigote Secretory Gel as a transmission determinant*. Recuperado el 13 de mayo de 2016 de <http://researchonline.lshtm.ac.uk/1775854/>
- Salam, N., Al-Shaqha, W. y Azzi, A. (2014) Leishmaniasis in the Middle East:

- Incidence and Epidemiology. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 8(10), 1-8. doi:10.1371/journal.pntd.0003208
- Sharma, G., Chowdhury, S., Sinha, S., Majumder, H. y Kumar, S. (2014) Antileishmanial activity evaluation of bis-lawsone analogs and DNA topoisomerase-I inhibition studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 29(2), 185–189. doi:10.3109/14756366.2013.765413
- Shirini, F., Seddighi, M., Mazloumi, M., Makhsous, M. y Abedini, M. (2015) One-pot synthesis of 4,4-(arylmethylene)-bis-(3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-ols) catalyzed by Brønsted acidic ionic liquid supported on nanoporous Na<sup>+</sup>-montmorillonite. *Journal of Molecular Liquids*. 208, 291–297. doi:10.1016/j.molliq.2015.04.027
- Subsecretaría de Prevención y Promoción de Salud. (2015). *Manual para el Diagnóstico, Tratamiento y Control de las Leishmaniasis*. Recuperado el 30 de mayo del 2016 de [www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/.../ManualLeishmaniasis2015.pdf](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/.../ManualLeishmaniasis2015.pdf)
- Sun, J., Kim, D., Guo, Y., Teng, Z., Li, Y., Zheng, L., Zhang, Z., Larson, A. y Lu, G. (2015) A c(RGDfE) conjugated multi-Functional nanomedicine delivery system for targeted pancreatic cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B*. 3, 1049-1058. doi:10.1039/C4TB01402B
- Tale, P., Tiwari, B., y Karade, N. (2011) Un-catalyzed tandem Knoevenagel–Michael reaction for the synthesis of 4,4'-(arylmethylene)bis(1H-pyrazol-5-ols) in aqueous medium. *Chinese Chemical Letters*. 22(12), 1415–1418. doi:10.1016/j.ccllet.2011.09.004
- Teixeira, D., Benchimol, M., Rodrigues, J., Crepaldi, P., Pimenta, P. y De Souza, W. (2013) The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. *Plos Pathogen*. 9(10), 1-4. doi:10.1371/journal.ppat.1003594
- Torrence, P., Fan, X. Zhang, X. y Loiseau, P. (2006) Structurally diverse 5-substituted pyrimidine nucleosides as inhibitors of *Leishmania donovani* promastigotes in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 16(19), 5047–5051. doi:10.1016/j.bmcl.2006.07.042

- Tsokana, C., Athanasiou, L., Valiakos, G., Spyrou, V., Manolakou, K. y Billinis, C. (2014). Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis. En Claborn, D. *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. (pp. 162-193). doi: 10-5772/57448
- Treiger, S., Osso, J., de Andrade, H. y do Nascimento, N. (2013) Biodistribution of meglumine antimoniate in healthy and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*-infected BALB/c mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 108(5), 623-630. doi:10.1590/0074-0276108052013014
- Von Stebut, E. (2015) Leishmaniasis. *Journal of the German Society of Dermatology*. 13(3), 191-201. doi:10.1111/ddg.12595
- Weigel, M., Armijos, R., Racines, R., Zurita, C., Izurieta, R., Herrera, E., Hinojosa, E., (1994) La leishmaniasis cutánea en la región subtropical del Ecuador: percepciones, conocimientos y tratamientos populares. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 117(5), 400–413.