



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA Y CITOTÓXICA DE  
COMPUESTOS EN BASE DE SCHIFF DERIVADOS DE 4-AMINOANTIPYRIDINA  
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

PhD Jorge Humberto Heredia Moya

Autor

Lizeth Carolina Dobronski Carrillo

Año

2016

### **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, 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

CI: 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”

---

Lizeth Carolina Dobronski Carrillo

CI: 172204596-8

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por sobre todo porque ha sido mi motor para seguir adelante.

A los investigadores del CIT Jorge H., Patricio R., Olalla B., Cherylin S., Sara C., Marco F. y Érika M., porque siempre estuvieron prestos a apoyarme durante todo este proceso.

Un agradecimiento especial a Wilson T., y Fernando, R., docentes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Lourdes y Ramiro gracias por su esfuerzo y su amor incondicional, por ustedes he podido culminar esta meta.

A mi novio Francisco porque nunca me dejaste caer y me diste siempre hermosas palabras de aliento.

A mis tíos James y Magdalena, y a mi abuelita Teresa, mi hermosa familia que siempre está pendiente de mí. Los amo.

## RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por el parásito protozoario flagelado del género *Leishmania* y es transmitido por las hembras del género *Lutzomyia*. El parásito presenta dos formas: amastigotes y promastigotes, y en humanos esta enfermedad puede presentarse como: leishmaniasis visceral, leishmaniasis cutánea difusa, leishmaniasis cutánea y leishmaniasis mucocutánea, de las cuales en el Ecuador solo hay reportes de las dos últimas. Para tratar esta enfermedad se usan medicamentos que suelen ser tóxicos, costosos y generan muchos efectos secundarios importantes, por lo que es necesario desarrollar nuevos tratamientos frente a esta enfermedad. En esta investigación se evaluó la actividad antiparasitaria y citotóxica de diferentes bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina frente a *Leishmania mexicana*. Se encontró que solo dos compuestos (**LD8** y **LD12**) fueron activos frente a los parásitos y los IC<sub>50</sub> calculados frente a *Leishmania* fueron: para **LD8** fue de 243,5 µM y de 145,9 µM para **LD12**, además, se determinó que el primer compuesto es de acción rápida mientras que el segundo es de acción lenta, sin embargo, ambos compuestos presentaron una alta citotoxicidad. Se descartó un daño en el potencial de membrana como posible mecanismo de acción de estos compuestos y se realizó un análisis de la relación estructura-actividad de los compuestos activos.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by the flagellate protozoan parasite of the genus *Leishmania* and is transmitted by female sandflies of the genus *Lutzomyia*. The parasite has two forms: amastigotes and promastigotes, and in humans, this disease can occur as; visceral leishmaniasis, diffuse cutaneous leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis and mucocutaneous leishmaniasis, of which in Ecuador there are only reports of the last two. To treat this disease, drugs used are often toxic, expensive and produce many significant side effects, therefore is necessary to develop new treatments against this disease. In this research the antiparasitic and cytotoxic activity of different Schiff bases derived from 4-aminoantipyrine against *Leishmania mexicana* was evaluated. It was found that only two compounds (**LD8** and **LD12**) were active against parasites and calculated  $IC_{50}$  against *Leishmania* were: to **LD8** was 243, 5  $\mu$ M and 145, 9  $\mu$ M for **LD12**, also, it was determined that the first compound is fast acting while second is slow acting, however, both compounds showed high cytotoxicity. Damage to the membrane potential as a possible mechanism of action of these compounds was discarded, and a structure–activity relationship of the active compounds was performed.

## ÍNDICE

1	CAPÍTULO I. Introducción.....	1
1.1	Antecedentes.....	1
1.2	Justificación.....	3
1.3	Alcance.....	4
1.4	Objetivos.....	5
1.4.1	Objetivo General.....	5
1.4.2	Objetivos Específicos.....	5
1.5	Hipótesis.....	5
2	CAPÍTULO II. Marco teórico.....	6
2.1	Leishmaniasis.....	6
2.1.1	<i>Leishmania</i> .....	7
2.1.2	Vector.....	12
2.1.3	Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis.....	12
2.1.4	Distribución geográfica en Ecuador.....	17
2.1.5	Epidemiología.....	19
2.1.6	Incidencia y prevalencia.....	20
2.1.7	Tratamientos.....	21
2.1.8	Prevención.....	28
2.2	Bases de Schiff.....	29
2.2.1	Síntesis.....	30
2.2.2	Actividades biológicas de diferentes bases de Schiff.....	33
2.2.3	Bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina.....	37
3	CAPÍTULO III. Metodología.....	39

3.1	Cultivo del estado promastigote del parásito <i>Leptomonas</i>	
3.2	Cultivo del estado promastigote del parásito <i>Leishmania mexicana</i> .....	39
3.3	Cultivo de macrófagos murinos inmortalizados derivados de médula ósea.....	40
3.4	Cultivo del estado amastigote intracelular del parásito <i>Leishmania mexicana</i> .....	40
3.5	Bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina .....	41
3.5.1	Síntesis.....	41
3.5.2	Concentraciones de bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina.....	42
3.6	Determinación de la actividad leishmanicida de los compuestos .....	43
3.7	Determinación de la actividad citotóxica de las bases de Schiff frente a macrófagos murinos inmortalizados derivados de médula ósea.....	44
3.8	Establecimiento de la concentración inhibitoria media (IC <sub>50</sub> ) de las bases de Schiff.....	45
3.9	Determinación del tiempo-respuesta.....	47
3.10	Daño del potencial de membrana por citometría de flujo.....	47
3.11	Análisis de la carga parasitaria y viabilidad celular por qRT-PCR .....	48
3.12	Análisis estadístico .....	50
4	<b>CAPÍTULO IV. Resultados y Discusión</b> .....	51
4.1	Síntesis de las bases de Schiff de 4-aminoantipirina.....	51

4.2	Análisis de la actividad antiparasitaria y leishmanicida de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina.....	
4.2.1	Concentración Inhibitoria media de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina frente a <i>Leptomonas</i> y <i>Leishmania mexicana</i> .....	57
4.3	Evaluación citotóxica de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina frente a macrófagos murinos inmortalizados derivados de médula ósea.....	59
4.3.1	Concentración citotóxica media de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina frente a macrófagos murinos inmortalizados derivados de médula ósea. ....	62
4.4	Análisis del tiempo respuesta de las concentraciones obtenidas en el IC <sub>50</sub> . ....	63
4.5	Análisis de la toxicidad que ocasionan los compuestos mediante citometría de flujo. ....	65
4.6	Análisis de la toxicidad luego de la infección y su posterior tratamiento mediante qRT-PCR .....	67
5	CAPÍTULO VI. Conclusiones y recomendaciones.....	71
5.1	Conclusiones.....	71
5.2	Recomendaciones .....	72
	REFERENCIAS .....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de los estados biológicos de la <i>Leishmania</i> ..	8
Figura 2. Ciclo de vida de la <i>Leishmania</i> .....	10
Figura 3. Clasificación taxonómica de las especies de <i>Leishmania spp.</i> .....	11
Figura 4. Vectores de la <i>Leishmania</i> .....	12
Figura 5. Lesiones nodulares en la parte externa del antebrazo derecho.....	13
Figura 6. Paciente infectado con leishmaniasis cutánea difusa. ....	15
Figura 7. Paciente de 29 años, infectado con VIH tipo I y con leishmaniasis mucocutánea.....	16
Figura 8. Paciente con leishmaniasis visceral.....	17
Figura 9. Casos de leishmaniasis reportados en Ecuador hasta la semana 53 del año 2015. ....	18
Figura 10. Estructura química de los medicamentos usados para el tratamiento de la leishmaniasis .....	22
Figura 11. Estructura general de una base de Schiff o imina.....	29
Figura 12. Síntesis de bases de Schiff <b>4</b> a partir de compuestos de carbonilo <b>1</b> y aminas primarias <b>2</b> .....	31
Figura 13. Síntesis oxidativa de iminas a partir de alcoholes y aminas.....	31
Figura 14. Síntesis oxidativa de iminas a partir de aminas. ....	32
Figura 15. Adición de reactivos organometálicos al cianuro. ....	32
Figura 16. Síntesis de cetiminas a partir de fenol y nitrilo. ....	33
Figura 17. Bases de Schiff derivadas de abacavir con actividad antiviral. ....	33
Figura 18. Bases de Schiff con actividad antibacterial. ....	34
Figura 19. Bases de Schiff con actividad antifúngica.. ....	34
Figura 20. Bases de Schiff con actividad antimalárica.. ....	34
Figura 21. Bases de Schiff con actividad antihelmíntica.. ....	35
Figura 22. Bases de Schiff con actividad antitubercular.....	35
Figura 23. Bases de Schiff con actividad anticonvulsiva. ....	36
Figura 24. Bases de Schiff con actividad antidepresiva.. ....	36
Figura 25. Bases de Schiff con actividad analgésica y anti-inflamatoria. ....	36
Figura 26. Bases de Schiff con actividad leishmanicida.....	37
Figura 27. Estructura química de la 4-aminoantipirina.. ....	38

Figura 28. Esquema de la síntesis de bases de Schiff <b>31</b> mediante la condensación de <b>30</b> con diferentes aldehídos aromáticos <b>32</b> .	41
Figura 29. Curva sigmoideal típica observada en el cálculo del IC <sub>50</sub> .	46
Figura 30. Esquema de la síntesis de las diferentes bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina.	51
Figura 31. Compuesto <b>LD12</b> .	53
Figura 32. Actividad antiparasitaria de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina frente a <i>Leptomonas</i> .	54
Figura 33. Actividad leishmanicida de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina frente a <i>Leishmania mexicana</i> .	55
Figura 34. Gráficos de dosis-respuesta de los compuestos <b>LD8</b> y <b>LD12</b> frente a <i>Leptomonas</i> empleados para el cálculo del IC <sub>50</sub> .	58
Figura 35. Gráficos de dosis-respuesta de los compuestos <b>LD8</b> y <b>LD12</b> frente a <i>Leishmania mexicana</i> empleados para el cálculo del IC <sub>50</sub> .	58
Figura 36. Gráficos de los valores de la IC <sub>50</sub> de los compuestos <b>LD8</b> y <b>LD12</b> para ambos parásitos.	59
Figura 37. Citotoxicidad de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina frente a macrófagos murinos inmortalizados derivados de médula ósea.	60
Figura 38. Gráfico de dosis-respuesta de <b>LD8</b> y <b>LD12</b> frente a macrófagos murinos inmortalizados de médula ósea usados para el cálculo del CC <sub>50</sub> .	63
Figura 39. Relación Tiempo-Respuesta de <b>LD8</b> y <b>LD12</b> frente a <i>Leishmania mexicana</i> .	64
Figura 40. Daño de membrana prococado por los compuestos <b>LD8</b> y <b>LD12</b> a diferentes concentraciones frente a <i>Leishmania mexicana</i> .	65
Figura 41. Toxicidad generada en células tras el tratamiento con el compuesto <b>LD8</b> .	68
Figura 42. Toxicidad generada en la <i>Leishmania mexicana</i> tras el tratamiento con el compuesto <b>LD8</b> .	69

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución geográfica de las especies de <i>Leishmania</i> , la forma clínica en el ser humano, los vectores y los huéspedes. ....	19
Tabla 2. Medicamentos utilizados para cada manifestación clínica de la leishmaniasis. ....	22
Tabla 3. Bases de Schiff utilizadas con las respectivas concentraciones de las soluciones madre .....	42
Tabla 4. Concentraciones utilizadas para la determinación del IC <sub>50</sub> .....	43
Tabla 5. Análisis estadístico de la actividad de <b>LD1-LD12</b> mediante ANOVA. ....	56
Tabla 6. Análisis estadístico de la actividad de los compuestos <b>LD1-LD12</b> en <i>Leptomonas</i> y <i>Leishmania mexicana</i> mediante la prueba de Tukey. ....	57
Tabla 7. Análisis estadístico de la citotoxicidad de <b>LD1-LD12</b> frente a macrófagos mediante ANOVA. ....	61
Tabla 8. Análisis estadístico de la actividad citotóxica de los compuestos <b>LD1-LD12</b> en macrófagos mediante la prueba de Tukey. ....	62
Tabla 9. Análisis estadístico obtenido del IC <sub>50</sub> y CC <sub>50</sub> de los compuestos <b>LD8</b> y <b>LD12</b> con el programa GraphPad Prism. ....	63
Tabla 10. Análisis estadístico del tiempo-respuesta en la actividad leishmanicida de <b>LD8</b> y <b>LD12</b> frente a <i>Leishmania mexicana</i> mediante ANOVA.....	64
Tabla 11. Análisis estadístico del daño al potencial de membrana en <i>Leishmania mexicana</i> tratado con <b>LD8</b> y <b>LD12</b> mediante ANOVA. ....	66
Tabla 12. Análisis estadístico del daño al potencial de membrana en <i>Leishmania mexicana</i> tratado con <b>LD8</b> y <b>LD12</b> mediante la prueba de Tukey. ....	67

## 1 CAPÍTULO I. Introducción

### 1.1 Antecedentes

Entre las enfermedades olvidadas se encuentran la leishmaniasis, la malaria, el chagas, la tripanosomiasis, la tuberculosis, el cólera, el rotavirus y la lepra, entre otras (Pedrique *et al*, 2013, pp. e373, e374). Según la OMS, la leishmaniasis ha sido clasificada en la categoría I de enfermedades emergentes que no presentan control para su erradicación (Montalván, 2013). La leishmaniasis es endémica en países pobres y en vías de desarrollo, afectando a las personas más pobres en países en desarrollo. A pesar de las investigaciones y los avances existentes en la producción de nuevos fármacos así como en el diagnóstico de la enfermedad, en su conjunto no se han logrado resultados lo suficientemente efectivos (Desjeux, 2004, p. 316; Chan, 2013). A estos factores también se suman, que debido al bajo incentivo económico que existe por parte de los gobiernos de turno y que los consumidores de los futuros fármacos serían personas de bajos recursos, las farmacéuticas han demostrado un interés muy limitado en la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos contra estas enfermedades olvidadas (Abdi, Gustafsson, Ericsson y Hellgren, 1995, p.1; Khan, Mughal, Samreen, Perveen y Choudhary, 2008, p. 243).

En una revisión bibliográfica realizada por Bañuls, Hide y Prugnotte (2007, p. 3), los autores señalan que estudios realizados entre los años 2000 al 2005 demostraron una reactivación de algunos focos en países como Italia, China, Israel y Brasil, pese a que otros estudios refieren la poca importancia que se le da a la severidad de este tipo de infecciones y su impacto socioeconómico. En los últimos años se le ha dado importancia a las coinfecciones, en especial con el VIH, ya que implica un problema más serio para los países desarrollados, aunque también se han reportado otro tipo de coinfecciones con malaria, schistosomiasis, tuberculosis y chagas (Selvapandiyan, Ahuja, Puri y Krishnan, 2015, p. 1659).

Históricamente el tratamiento de la leishmaniasis se ha basado en el uso de 6 fármacos, de los cuales, los más usados son los medicamentos denominados de primera línea, que consisten en preparaciones de antimoniales pentavalentes tales como el Pentostam® (estiboglucano de sodio) y el Glucantime® (antimoniato *N*-metilglucamina) (Gutiérrez, Seabra, Reguera, Khandare y Calderón, 2016, p. 154). Ambos medicamentos fueron diseñados y hasta la actualidad son utilizados para combatir todos los tipos de leishmaniasis (visceral, cutánea y mucocutánea). Las dos formulaciones antes mencionadas han resultado ser bastante efectivas contra la enfermedad, pero su eficacia se mide en relación a la cantidad de antimonio que se administra al organismo, lo que provoca toxicidad en el individuo. Además, los fármacos deben ser administrados por periodos largos (mínimo 21 días), ocasionando que los pacientes no logren terminar el tratamiento (Abdi *et al.*, 1995, p.1). Cuando estos medicamentos no resultan efectivos, se utilizan los tratamientos de segunda línea que incluyen la anfotericina B y la pentamidina, para el tratamiento de la leishmaniasis visceral; mientras que para tratar la leishmaniasis cutánea y visceral se utilizan la miltefosina y el fluconazol. El uso de estos medicamentos presenta varios problemas tales como: su alto costo, la alta toxicidad, la difícil administración y los serios efectos secundarios (Mohapatra, 2014, pp. 5, 6). Debido a todo lo antes expuesto, surge la necesidad del abordaje de nuevas líneas de investigación, con el fin de desarrollar nuevos medicamentos y vacunas.

Las bases de Schiff son compuestos orgánicos que contienen un doble enlace carbono-nitrógeno (imino), con el átomo de nitrógeno enlazado a un grupo arilo o alquilo, y se obtienen, principalmente, mediante la condensación de una amina primaria alifática o aromática con un compuesto activo de carbonilo. Estos compuestos son intermediarios importantes en un número de reacciones enzimáticas que involucran el grupo amino de ciertas enzimas con el grupo carbonilo del sustrato (Eliot y Kirsch, 2004, pp. 383-385), son ligandos comunes en química de coordinación (Kumar, Nath y Saxena, 2009, p. 991) y presentan una amplia gama de actividades biológicas (Azam, Singh, Khokhra y Prakash, 2007, pp. 446-447; Kajal, Bala, Kamboj, Sharma y Saini, 2013, p. 1; Da Silva *et*

*al.*, 2011, p. 1). Las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina y sus complejos metálicos muestran una gran variedad de actividades biológicas y aplicaciones (Alam, Lee y Bari, 2014, p. 613; Elemike, Oviawe y Otuokere, 2011, p. 6). Es importante mencionar que no existen reportes previos de la actividad leishmanicida de bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina, razón por la cual este proyecto de titulación se propone investigar la actividad leishmanicida de estos compuestos, y de esta forma contribuir en el estudio de nuevas moléculas con actividad potencial contra este parásito y que puedan emplearse como punto de partida para el desarrollo de nuevos tratamientos.

## 1.2 Justificación

Estudios realizados en los últimos años muestran que *Leishmania mexicana* es la principal especie de este parásito que se encuentra ampliamente distribuida en las zonas endémicas en el Ecuador (Kato *et al.*, 2005, pp. 88, 91; Kato *et al.*, 2007, pp. 324-326), cubriendo las zonas subtropicales, tropicales y altas andinas del país. Esta especie es responsable de la leishmaniasis cutánea, que según la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, es la principal forma en la que se manifiesta esta infección en el Ecuador (Kato, Calvopiña, Criollo y Hashiguchi, 2013, p. 2). Es por esto que se ha escogido esta especie de *Leishmania* para su estudio en este trabajo de titulación.

Previo a la realización de este trabajo se habían probado las doce bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina frente a *Leptomonas*. Las *Leptomonas* son parásitos protozoarios pertenecientes a la familia *Trypanosomatida*, orden *Kinetoplastida* al igual que la *Leishmania*. Hasta hace algunos años se sabía que estos parásitos no eran capaces de infectar a los humanos, si no, que su ciclo de vida se restringía a diferentes insectos que no incluían flebótomos. Sin embargo, en la India se ha identificado una coinfección *Leptomonas-Leishmania* en pacientes con leishmaniasis visceral e incluso se han reportado vectores de *Leishmania* infectados con *Leptomonas* en Nepal (Bhattarai *et al.*, 2009, p. 1090). Tanto *Leptomonas* y *Leishmania* presentan algunas características

similares como por ejemplo: identidad de sus secuencias genómicas, antigenicidad y fisiología. Previo a estos importantes hallazgos, se conocía que *Leptomonas* solo presentaba la forma promastigote y no la amastigote. Sin embargo, tras infectar ratones con *Leptomonas*, los parásitos se transformaron en amastigotes en los macrófagos de los animales, con la peculiaridad de que en esta fase eran incapaces de replicarse. Por lo tanto, a pesar de que no existe ninguna evidencia que indique que este tipo de coinfección pudiera darse en pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea tampoco se podría descartar esta posibilidad. Se conoce que los tratamientos comerciales que se utilizan para tratar la leishmaniasis suelen ser efectivos contra las *Leptomonas*, aunque se necesitan más estudios que sustenten estas evidencias (Selvapandiyar *et al.*, 2015, pp. 1657-1660).

Como compuestos de estudio se han escogido varias bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina debido a la facilidad de su síntesis, así como también a la variedad de actividades biológicas reportadas para este tipo de compuestos.

En base a lo antes mencionado y a la amplia fundamentación bibliográfica que apoya el estudio, el propósito de esta investigación consiste en evaluar si los compuestos previamente descritos tienen actividad antiparasitaria frente a *Leishmania mexicana* tanto en su forma de promastigote, como amastigotes intracelulares que infectan macrófagos de forma *in vitro*.

### **1.3 Alcance**

Esta investigación permitirá conocer la actividad leishmanicida de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina frente a *Leishmania mexicana* en estado de promastigotes y amastigotes intracelulares que infectan macrófagos murinos inmortalizados derivados de médula ósea. Se propone además, determinar la carga parasitaria y viabilidad celular tras el tratamiento con los diferentes compuestos, lo que permitirá comprobar la efectividad de los mismos en comparación con los medicamentos que se emplean de forma rutinaria en el

tratamiento de esta enfermedad. Por último, se propone estudiar si el mecanismo de acción de estos compuestos sobre el parásito, en su forma promastigote, se basa en daños en la membrana celular del mismo. Este trabajo de investigación se propone contribuir con información relevante que incentive futuros estudios basados en estos compuestos o compuestos similares para el tratamiento de la leishmaniasis en sus formas cutánea y mucocutánea.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo General**

Evaluar la actividad leishmanicida y citotóxica de diferentes bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina.

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- I. Determinar la actividad leishmanicida de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina frente a *Leishmania mexicana*.
- II. Establecer la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina.
- III. Analizar la actividad tóxica de los compuestos mencionados en macrófagos infectados y en los parásitos mediante citometría de flujo y qRT-PCR.

## **1.5 Hipótesis**

Las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina presentan actividad leishmanicida frente a *Leishmania mexicana* tanto en los estados de promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares.

## 2 CAPÍTULO II. Marco teórico

### 2.1 Leishmaniasis

Se han encontrado cerámicas de las culturas Preincaicas de Ecuador, Colombia y Perú, en las cuales se representaban lesiones y deformaciones faciales características de la leishmaniasis y que han ayudado a estimar que esta enfermedad ya se encontraba presente en Sudamérica en los años 400-900 DC. Del mismo modo, debido a cerámicas encontradas en Ecuador específicamente, se conoce que la leishmaniasis cutánea y la mucocutánea aparecieron antes de la llegada de los españoles, incluso los conquistadores escribían acerca de lesiones que presentaban los incas en su piel (Calvopiña, Armijos y Hashinguchi, 2004, p. 663).

La leishmaniasis es una enfermedad causada por parásitos del género *Leishmania* cuando es transmitido por el flebótomo hembra del género *Lutzomyia*, vector identificado para América (Alcolea *et al.*, 2014, p. 2). Se debe tomar en cuenta que la enfermedad también puede ser transmitida por otras vías entre las que se encuentran transfusiones sanguíneas y transmisión congénita (Gállego, 2004, p. 666). Afecta a 88 países a nivel mundial, de los cuales 72 son países desarrollados y 13 son subdesarrollados (Desjeux, 2004, p. 307; Bañuls *et al.*, 2007, p. 2). En Ecuador es considerada un problema de salud pública, debido a que tiene una gran dispersión en el territorio y afecta principalmente a las personas más pobres que habitan las zonas rurales. Anualmente en nuestro país existe un promedio de 3'500.000 habitantes que se encuentran en riesgo de transmisión (Montalván, 2013).

Esta parasitosis es prevalente en lugares donde tanto los vectores como los huéspedes se encuentran en número suficiente, ya que existe una permanente transmisión (Berman, 1997, p. 684).

### 2.1.1 *Leishmania*

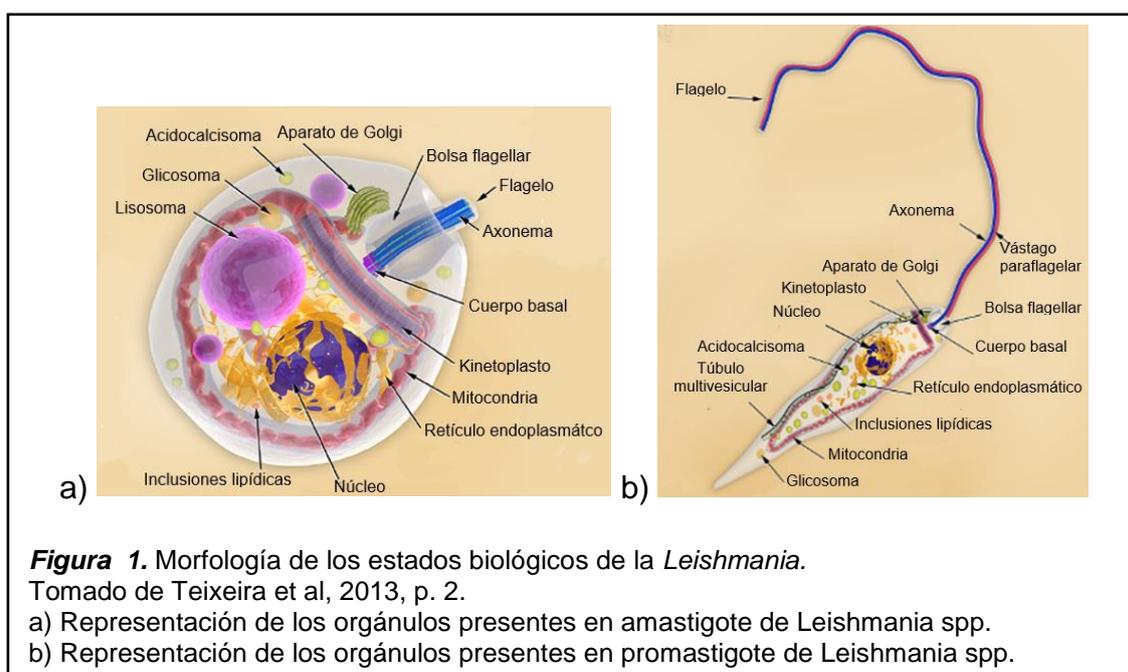
La *Leishmania* es un parásito protozoario flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida y la familia Trypanosomatidae. Requiere de un vector, ya sea *Phlebotomus* o *Lutzomyia*, que se alimente de sangre infectada con el parásito para poder completar su ciclo de vida y seguir reproduciéndose y propagándose (Bogtish, Carter y Oeltmann, 2005, p. 97). El parásito puede infectar de manera natural a diferentes órdenes de mamíferos, entre los cuales se encuentran: cánidos, primates no humanos, marsupiales, roedores y cionidos. Como se puede evidenciar, los humanos no se encuentran en esta lista debido a que se cree que en la mayoría de casos son huéspedes accidentales. La capacidad que tiene este parásito de infectar diferentes huéspedes se debe a que su ciclo no se restringe a un único ambiente, ya que una sola especie puede encontrarse en diferentes entornos y desarrollarse en diferentes especies de flebótomos. Otro factor que lo convierte en un microorganismo complicado es que se ha encontrado diferentes especies de *Leishmania* en un mismo huésped. Este microorganismo parasita de manera eficiente los macrófagos presentes en mamíferos (Bañuls *et al.*, 2007, pp. 5, 9). También es importante mencionar que diversas especies de *Leishmania* actúan como patógenos oportunistas y suelen incrementar su infección en pacientes con otros trastornos como el VIH (Alcolea *et al.*, 2014, p. 2).

A pesar de los adelantos en la investigación a nivel molecular y el mayor entendimiento en la evolución genética, hasta la actualidad no se tiene muy claro el funcionamiento de este microorganismo en poblaciones en un hábitat natural. Esto se debe a que este parásito tiene un ciclo de vida bastante complejo ya que puede llegar a infectar a un rango amplio de huéspedes, se encuentra distribuido en diferentes nichos ecológicos, y además, puede producir una variedad de síntomas clínicos muy amplios en las personas infectadas. Es por esto que la *Leishmania* es considerada como un modelo biológico complejo desde diferentes puntos tales como el ecológico, genético y filogenético (Bañuls *et al.*, 2007, p. 3).

### 2.1.1.1 Morfología

Se pueden diferenciar dos formas del parásito: amastigote y promastigote. Los amastigotes son considerados como parásitos obligatorios de los macrófagos y rara vez de otro tipo de células de las que se encuentran en el sistema inmune del huésped (Croft y Coombs, 2003, p. 502). Presentan una forma ovoide y se transforman cuando ingresan a las células del sistema inmune. Morfológicamente presentan un núcleo voluminoso y pueden o no tener un pequeño flagelo (Fig. 1a) (Bogtish *et al.*, 2005, pp. 98-101).

Los promastigotes solo se encuentran en el insecto. Difieren estructuralmente de los amastigotes ya que son más elongados que los anteriores y desarrollan un flagelo libre que les sirve tanto para movilizarse a través del medio como para fijarse en la pared intestinal del vector. Este flagelo emerge desde un cuerpo basal que se encuentra en estrecha relación con el kinetoplasto (estructura característica de los miembros pertenecientes al orden kinetoplastida) (Fig. 1b). Subyacente a la membrana plasmática, se forma una red subpelicular de microtúbulos que provee un soporte estructural limitado en ambas formas parasitarias (Bogtish *et al.*, 2005, pp. 98-101).



**Figura 1.** Morfología de los estados biológicos de la *Leishmania*.

Tomado de Teixeira *et al.*, 2013, p. 2.

a) Representación de los orgánulos presentes en amastigote de *Leishmania* spp.

b) Representación de los orgánulos presentes en promastigote de *Leishmania* spp.

### 2.1.1.2 Composición genética

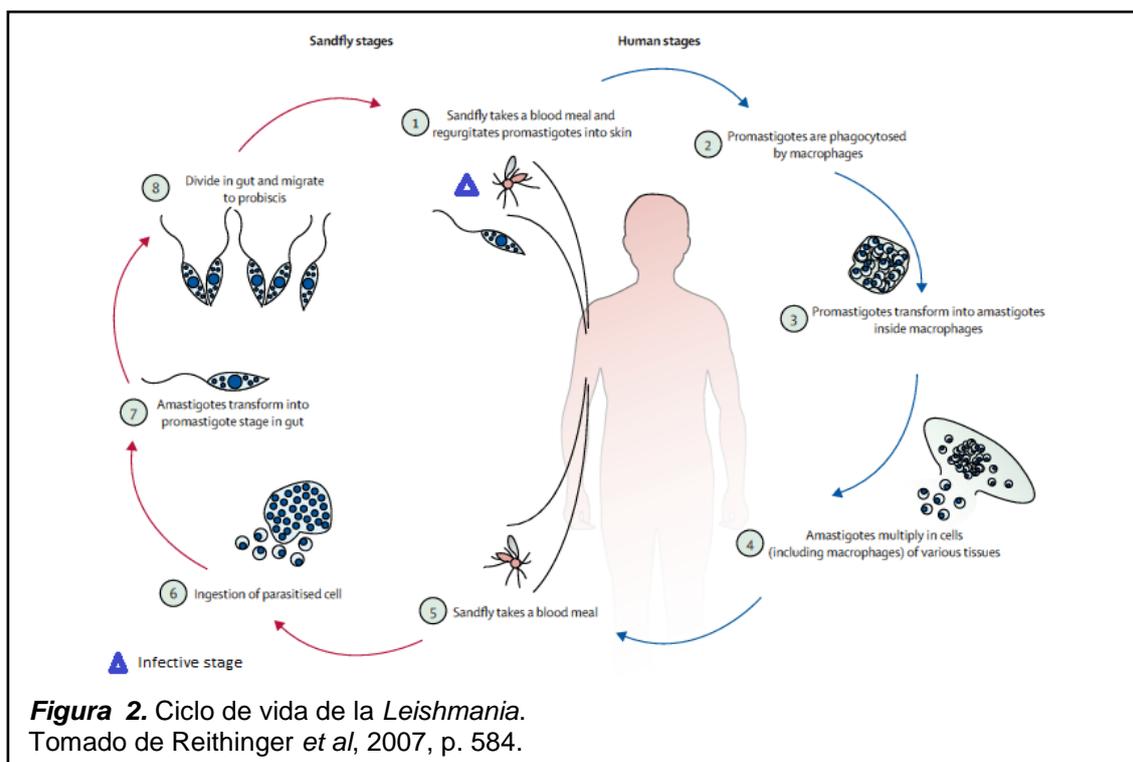
Varios estudios han sugerido que algunos cromosomas de *Leishmania* son diploides y otros son aneuploides. (Bañuls *et al.*, 2007, p. 14). El DNA mitocondrial se encuentra en el kinetoplasto (kDNA) (Bogtish *et al.*, 2005, pp. 98-101), que constituye el 10-20% del DNA total y consiste en una red formada por varias cadenas circulares de DNA concatenados que se dividen en dos clases: los maxicírculos homogéneos y los minicírculos heterogéneos. Los maxicírculos son considerados como la parte funcional del DNA mitocondrial y tienen un peso de 20kb mientras que los minicírculos tienen un peso aproximado de ~0.8kb (Bañuls *et al.*, 2007, p. 15). Se piensa que el kDNA es el responsable de que ocurra la metamorfosis de una forma a otra del parásito (Bogtish *et al.*, 2005, pp. 98-101).

### 2.1.1.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida del parásito es dimórfico, ya que presenta dos morfologías, y es digenético, pues se desarrolla en diferentes huéspedes (Alcolea *et al.*, 2014, p. 2). Estas dos etapas son: la etapa extracelular o promastigote y la etapa intracelular o amastigote (Bañuls *et al.*, 2007, p. 4).

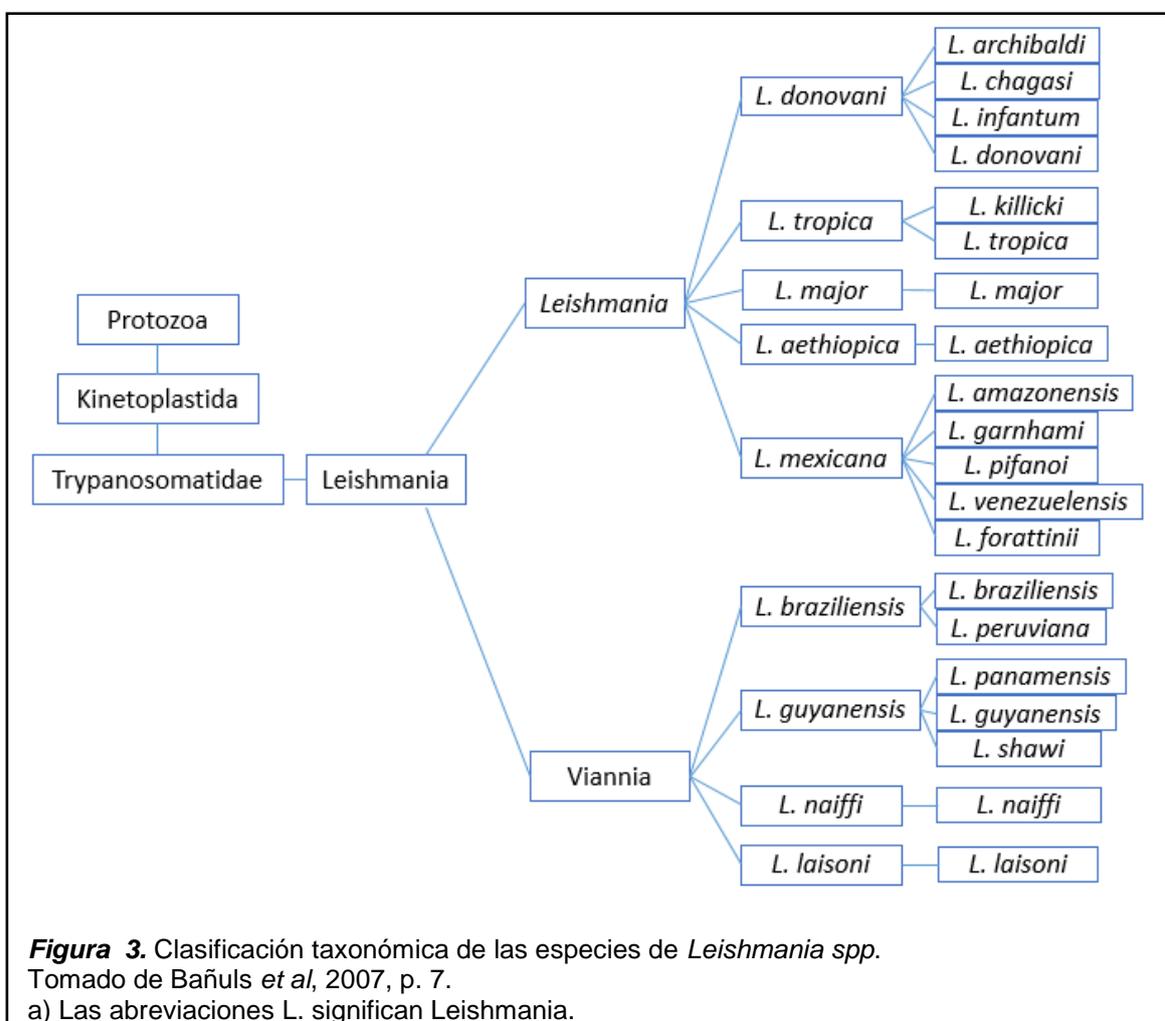
El ciclo de vida comienza cuando un flebótomo hembra del género *Lutzomyia* se alimenta de sangre de un huésped vertebrado que contiene macrófagos infectados con amastigotes, y los parásitos ingresan en su organismo; estos se transforman en promastigotes procíclicos en el intestino medio del vector, y mientras los promastigotes se encuentren anclados al intestino del vector, la sangre es excretada de su organismo (Descoteaux y Turco, 1999, pp. 342, 345). Los promastigotes procíclicos migran a la probóscide del vector y se diferencian en promastigotes metacíclicos (Alcolea *et al.*, 2014, p. 2), esta fase también es conocida como la fase infectiva, la cual dura entre 8 y 20 días desde que fue ingerido (Desjeux, 2004, p. 306). El parásito es transmitido al huésped durante

la picadura de la mosca; las partes bucales de la misma cortan la piel (Bates, 2007, p. 1099) e inyectan saliva al huésped, para evitar que la sangre se coagule, liberando promastigotes metacíclicos a la piel del hospedero por medio de la regurgitación. Los promastigotes se adhieren a la superficie celular con la ayuda del flagelo, por medio de la unión de los lipofosfoglicanos y la glicoproteína GP63 presentes en la superficie del parásito, con los receptores que se encuentran en los macrófagos (Teixeira *et al.*, 2013, pp. 1-2). De inmediato los parásitos son fagocitados por los macrófagos dentro de unas vacuolas especializadas denominadas fagosomas o vacuolas fagocíticas, en donde se transforman en amastigotes (Alcolea *et al.*, 2014, p. 2), algunos de los cuales se quedan unidos al macrófago mientras que otros quedan libres en la vacuola (Teixeira *et al.*, 2013, p. 2) y logran reproducirse por fisión binaria (Bañuls *et al.*, 2007, p. 6). Esta transformación se da gracias a la alta temperatura y el bajo pH que encuentra el parásito dentro del fagosoma y estas condiciones van a dar una señal para su diferenciación (Descoteaux y Turco, 1999, p. 343; Bates *et al.*, 2007, p. 1099). Los parásitos incrementan en número hasta que la célula finalmente se lisa, el material sale logrando infectar otras células y continúa el ciclo (Fig. 2) (Bañuls *et al.*, 2007, p. 6).



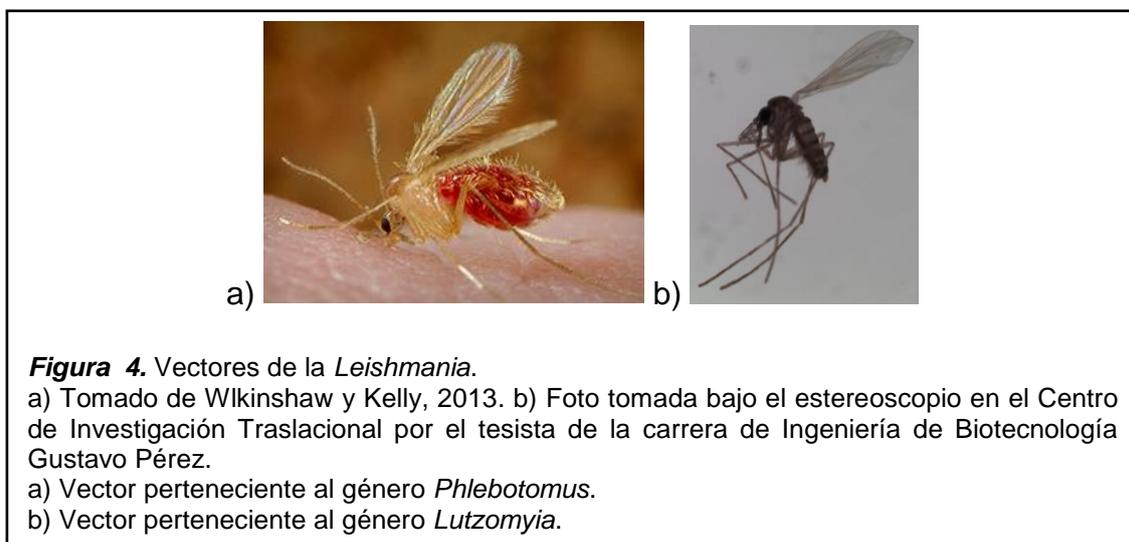
### 2.1.1.4 Taxonomía

A partir de 1970 se han utilizado varios criterios para definir las distintas especies del parásito, tales como datos inmunológicos, bioquímicos y genéticos (Bañuls *et al.*, 2007, pp. 6-7). Este parásito pertenece al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae y género *Leishmania* (Fig. 3) (Bogtish *et al.*, 2005, pp. 55-56). Todos los miembros que pertenecen al género *Leishmania* son parásitos que afectan a los mamíferos. El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, esta clasificación depende de la locación del parásito en el intestino del vector (Bañuls *et al.*, 2007, pp. 6-7).



### 2.1.2 Vector

Los vectores invertebrados de la leishmaniasis son insectos pequeños pertenecientes al orden Diptera, conocidos como flebótomos (Bañuls *et al.*, 2007, p. 5), de la familia Psychodidae (Alcolea *et al.*, 2014, p. 2) y subfamilia Phlebotominae. Se han descrito seis géneros, de los cuales dos son considerados de importancia médica: *Phlebotomus* que se distribuyen en Europa, África y Asia y que se subdivide en 12 subgéneros; y *Lutzomyia* que se encuentra en América y que se subdivide en 25 subgéneros (Fig. 4). Estos dípteros varían de una región a otra, en algunos casos pueden portar una o varias especies mientras que existen algunas especies de *Phlebotomus* que solo permiten el crecimiento de un solo tipo de *Leishmania* (Bañuls *et al.*, 2007, p. 5). En nuestro país se han descrito más de 60 especies de flebótomos en donde se encuentran incluidas 55 especies que pertenecen al género *Lutzomyia* (Calvopiña *et al.*, 2014, pp. 663, 667).



### 2.1.3 Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis

En animales menos adaptados, entre los que se encuentran los humanos, la infección que produce este tipo de parásitos puede variar en un amplio rango de patologías. En algunos casos la enfermedad es asintomática, mientras que en

otros aparecen pápulas en la piel y daño de las mucosas. Los casos más graves se presentan en la forma visceral. En humanos esta enfermedad puede presentarse en cuatro formas: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis cutánea difusa, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral (Bañuls *et al.*, 2007, p. 10).

### 2.1.3.1 Leishmaniasis cutánea

Esta manifestación clínica es causada por la proliferación del parásito en las células fagocíticas que se sitúan en la piel. En América se ha logrado identificar que los principales causantes son los miembros pertenecientes a los complejos de *L. mexicana* como son *L. mexicana*, *L. venezuelensis* y *L. amazonensis*; y los complejos de *L. braziliensis* en los que se encuentran *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis*. La forma cutánea normalmente empieza con la aparición de pápulas, las cuales se transforman en úlceras y luego finalmente desaparecen de manera espontánea. Las cicatrices que dejan estas laceraciones pueden llegar a durar años luego de que la enfermedad sanó. Estas lesiones muy rara vez llegan a convertirse en nodulares (Fig. 5) (Berman, 1997, p. 686).

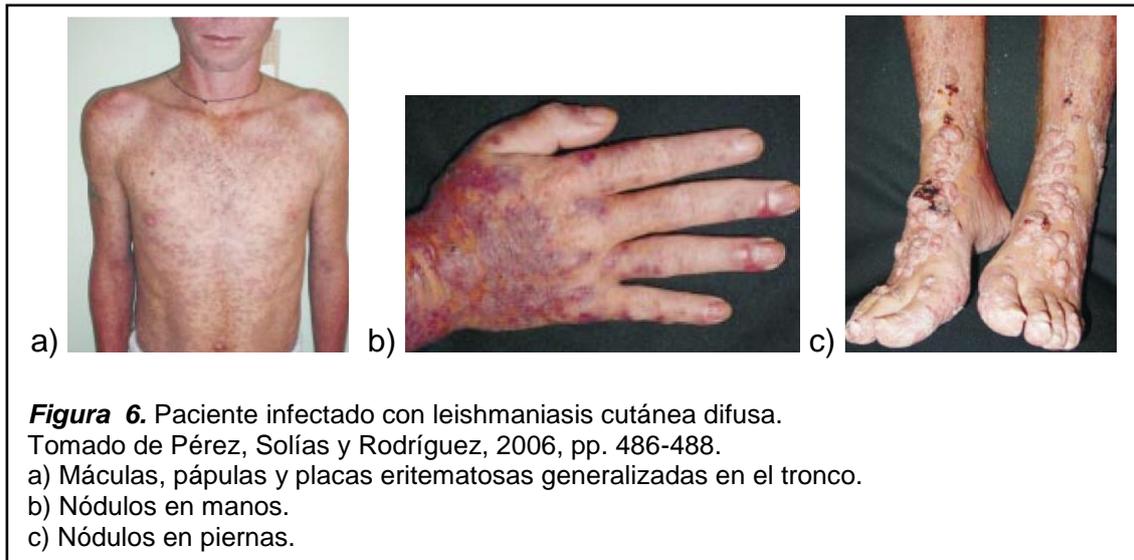


**Figura 5.** Lesiones nodulares en la parte externa del antebrazo derecho. Al momento de tomar estas imágenes el paciente tenía 31 años y era procedentes de México. Tomado de Rábago *et al*, 2006, p. 344.

En Ecuador se pueden diferenciar dos tipos de leishmaniasis cutánea, dependiendo de la posición geográfica en la que se encuentre el paciente: el tipo andino y el tipo de tierras bajas, sin embargo, este tipo de leishmaniasis suele curarse sola, por lo que estos casos no son reportados a las instituciones competentes lo que impide la obtención de datos fiables (Calvopiña *et al.*, 2014, p. 663). El tipo andino se encuentra en las tierras altas del país y se caracteriza porque presenta una sola lesión, con un tamaño aproximado de 5 mm de diámetro. Según datos obtenidos por Calvopiña y sus colaboradores (2014, pp. 665, 667), el 92% de las lesiones se producen en la cara. El tipo de las tierras bajas se caracteriza porque se generan varias lesiones, las cuales, en el 53.8 al 92% de los casos afectan las extremidades, mientras que otras partes del cuerpo como el tronco, los párpados, el cuero cabelludo y genitales también suelen ser afectadas, pero en menor proporción. Estas lesiones son húmedas y pueden asociarse a infecciones bacterianas secundarias.

### **2.1.3.2 Leishmaniasis cutánea difusa**

La leishmaniasis cutánea difusa es una variación crónica y progresiva de la leishmaniasis cutánea que se conoce como una enfermedad de larga duración (Fig. 6), y ocurre debido a que los individuos presentan afectaciones en su respuesta inmune mediada por células (Kumar, 2013, p. 3). La severidad de este tipo de infección está dada por las lesiones diseminadas, ya que el organismo no se cura de manera espontánea y existen recaídas tras haber culminado el tratamiento establecido (Bañuls *et al.*, 2007, p. 10; Desjeux, 2004, pp. 306, 309). En América es causada por el complejo de *Leishmania mexicana* y en Europa, Asia y África por *Leishmania aethiopica* (Kumar, 2013, p. 3).



### 2.1.3.3 Leishmaniasis mucocutánea

La leishmaniasis mucocutánea también conocida como espundia (Bañuls *et al.*, 2007, p. 11), se produce cuando las membranas de las mucosas nasal y bucal son afectadas por el parásito pudiendo ser destruidas de manera parcial o completa. Entre las mucosas afectadas se encuentran las del tabique, faringe, labio superior (Calvopiña *et al.*, 2004, p. 667), boca, garganta y nariz, como se explica en el informe de la reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis (Organización Mundial de la Salud, 2010). La infección empieza por la mucosa de la nariz, se puede extender hacia la laringe y la orofaringe, y luego ocurre la infección en la boca (Berman, J., 1997, p. 686). Todo este cuadro ocasiona disnea y puede provocar deformidades en la cara e incluso mutilaciones (Fig. 7) (Bañuls *et al.*, 2007, p. 11). Esta enfermedad puede ser la secuela de una leishmaniasis cutánea que no fue tratada de manera correcta. No sana de manera espontánea, evoluciona de manera lenta, y puede extenderse por meses y hasta años. Se ha identificado como primer causal a la *Leishmania braziliensis* (Berman, 1997, p. 686) y suele ser prevalente en bosques tropicales (Calvopiña *et al.*, 2004, p. 663).



#### 2.1.3.4 Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral es conocida como kala azar. Se desarrolla en el sistema de fagocitos mononucleares del hígado y bazo, los parásitos se multiplican únicamente dentro de las células fagocíticas. En el caso de América es causada por la especie *Leishmania infantum* (*Leishmania chagasi*). Esta enfermedad suele ser fatal si no es tratada (Berman, 1997, p. 684).

Según un estudio realizado por Berman (1997, pp. 684-685) existen cuatro presentaciones clínicas que son:

- Leishmaniasis visceral clásica. Se caracteriza por presentar síntomas como fiebre, pancitopenia y hepatoesplenomegalia (Fig. 8).
- Enfermedad visceral leve, no progresa a kala azar clásico. Según este estudio se pueden presentar diferentes manifestaciones como fiebre, malestar, organomegalia, fatiga crónica, tos, dolores abdominales y diarrea.

- Leishmaniasis visceral como componente del SIDA, debido a que, como ya se había mencionado anteriormente, la *Leishmania* es un parásito oportunista.
- Enfermedad sudanesa que incluye leishmaniasis post kala azar. También se la conoce como PKDL por sus siglas en inglés (Post-Kala azar Dermal Leishmaniasis). La leishmaniasis visceral es una enfermedad endémica en Sudán, este tipo de leishmaniasis se caracteriza porque los pacientes muestran máculas y pápulas que primero rodean la boca. Aquellas que no sanan de manera espontánea se dispersan por toda la cara o por otras partes del cuerpo y llegan a formar nódulos y ulceraciones, además, se han identificado algunos síntomas como ardor de pies así como otros síntomas neurológicos.



**Figura 8.** Paciente con leishmaniasis visceral.

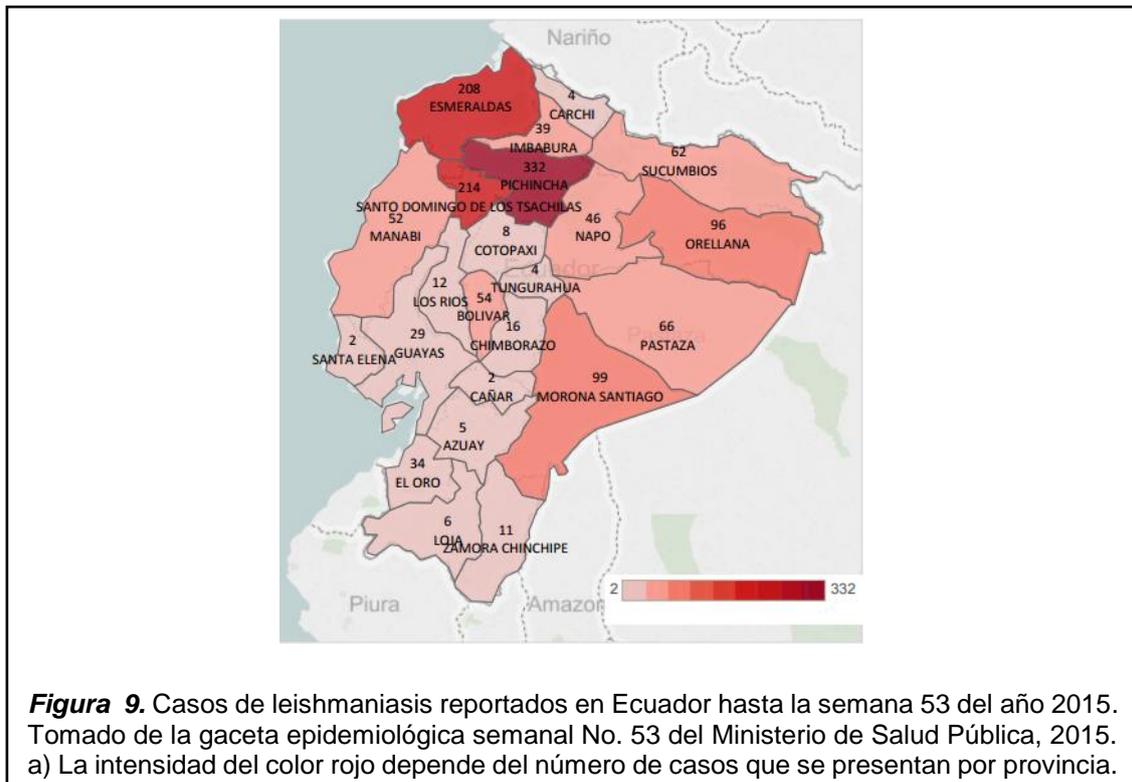
Tomado de González *et al*, 2008, p. 33.

a) Presenta inflamación del bazo (esplenomegalia) e inflamación del hígado (hepatomegalia).

#### 2.1.4 Distribución geográfica en Ecuador

El incremento en la incidencia de la leishmaniasis puede atribuirse a diferentes causas, por ejemplo, migraciones internas a zonas alejadas del espacio urbano, migración de los vectores ocasionada por el cambio climático, cambios en el uso

de la tierra y el movimiento de personas que se encuentran en zonas no endémicas (turistas o inmigrantes). Estos factores pueden provocar un aumento de la exposición de los seres humanos a los ciclos de vida zoonóticos del parásito (Calvopiña *et al.*, 2004, p. 665).



Se han reportado casos en 23 de las 24 provincias del país, siendo Las Islas Galápagos la única excepción tal como se menciona en el proyecto de vigilancia y control de vectores para la prevención de la transmisión de enfermedades metaxénicas en el Ecuador por el Servicio Nacional de Control de enfermedades transmitidas por vectores artrópodos (SNEM) (Montalván, 2013). La última evidencia que se obtuvo de casos de leishmaniasis en Ecuador fue hasta la semana 53 del año 2015 cuando se reportaron un total de 1.401 casos, de los cuales el mayor número de afectados se encontraron en la provincia de Pichincha (Fig. 9), según se menciona en la gaceta epidemiológica No. 23 (Ministerio de Salud Pública, 2015). En el Ecuador se han podido identificar seis especies de *Leishmania*: *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L.*

*amazonensis*, *L. major-like* y *L. mexicana*, y como se puede observar en la tabla 1 cada especie provoca un tipo de manifestación clínica (ver tabla 1).

**Tabla 1.** Distribución geográfica de las especies de *Leishmania*, la forma clínica en el ser humano, los vectores y los huéspedes.

PARÁSITO	FORMA CLÍNICA	VECTOR	HUÉSPED
<b>PACÍFICO</b>			
<i>L. panamensis</i>	LCL, LCD	<i>Lu. trapidoi</i>	<i>Canis familiaris</i>
<i>L. guyanensis</i>	LCL	<i>Lu. trapidoi</i>	NI
<i>L. panamensis/guyanensis</i>	LCL	<i>Lu. trapidoi</i>	<i>Canis familiaris</i>
<i>L. braziliensis</i>	LCL	NI	NI
<i>L. amazonensis</i>	LCL	NI	<i>Sciurus vulgaris</i> <i>Potos flavus</i> <i>Tam tetradacyla</i>
<i>L. major-like</i>	LCL	NI	NI
<i>L. mexicana</i>	LCL, LCD	NI	NI
<b>REGIÓN ANDINA</b>			
<i>L. mexicana</i>	LCL	<i>Lu. ayacuchensis</i>	<i>Canis familiaris</i>
<i>L. major-like</i>	LCL, LCD	NI	NI
<b>REGIÓN AMAZÓNICA</b>			
<i>L. braziliensis</i>	LCL, LMC	NI	NI
<i>L. braziliensis/panamensis-guyanensis</i>	LCL	<i>Lu. serrana</i>	NI

Nota: las abreviaciones mencionadas en el cuadro significan: LCL, Leishmaniasis cutánea localizada; LCD, Leishmaniasis cutánea difusa; LMC, Leishmaniasis mucocutánea; *Lu.*, Lutzomyia; NI, No identificado. Tomado de Calvopiña *et al.*, 2004, p. 666.

### 2.1.5 Epidemiología

La epidemiología de este parásito es bastante diversa ya que se han podido identificar 20 especies de *Leishmania* que son patógenos para los seres humanos (Desjeux, 2004, p. 306).

Se han descrito 3 ciclos epidemiológicos entre los que se encuentran:

1. Ciclo primitivo o silvestre: en este caso la infección a humanos es estrictamente accidental y la transmisión se produce en focos silvestres.

2. Ciclo secundario o peridoméstico: el huésped del parásito es un animal doméstico o peridoméstico. La enfermedad es transmitida por las moscas antropofílicas, es decir moscas que se encuentran especialmente adaptadas para parasitar al ser humano.
3. Ciclo terciario o estrictamente antroponótico: no existen los huéspedes animales. Los vectores son antroponóticos, es decir que su reservorio es el ser humano (Bañuls *et al.*, 2007, pp. 7-8).

Las tendencias epidemiológicas de la *Leishmania* están relacionadas con varios factores de riesgo:

- Cambios del medio ambiente en donde circulan.
- Migración de personas de zonas rurales a zonas urbanas.
- Ampliación de las ciudades hacia las zonas donde son endémicos los parásitos, ya sea por construcción de nuevas carreteras, para generar minería, promoción del turismo hacia zonas más apartadas, entre otras.
- La malnutrición es otro factor de riesgo debido a que se incrementa la severidad de la enfermedad, ya que el sistema inmune del paciente suele deprimirse (Desjeux, 2004, p. 308).

### **2.1.6 Incidencia y prevalencia**

La Organización Mundial de la Salud, en el año 2002, estimó que el número de casos nuevos de leishmaniasis por año es de 2.357.000 y el número de personas que se encuentran en riesgo de contraer esta enfermedad es de 350 millones (Bañuls *et al.*, 2007, p. 2). A pesar de que estos datos son bastante confiables se considera que existen más casos de los que son reportados, debido a diferentes factores como por ejemplo:

- Un número considerable de casos no son diagnosticados, son mal diagnosticados o no son reportados por el paciente o el médico tratante.
- En algunos países no se la considera como una enfermedad de declaración obligatoria.

- La distribución de los lugares de transmisión dentro de las zonas endémicas es, por lo general, discontinua (Desjeux, 2004, p. 307).

### 2.1.7 Tratamientos

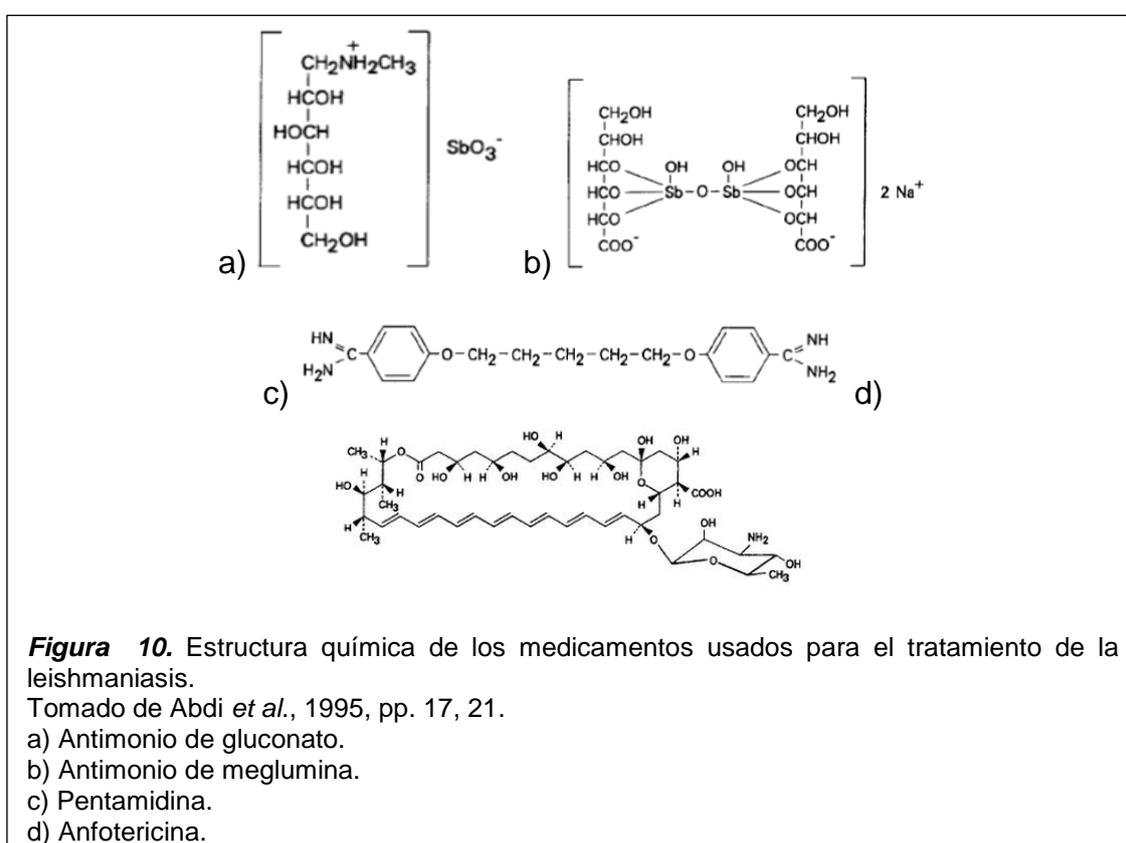
Tanto el Ministerio de Salud pública del Ecuador como la OMS recomiendan que se usen los antimoniales pentavalentes como fármacos de primera línea. De estos, el antimoniato de meglumina (Glucantime®) (Fig. 10a) es el único que se encuentra disponible para el público sin receta médica y suele ser distribuido de manera gratuita por el Ministerio. Sin embargo, los tratamientos tradicionales son ampliamente usados en zonas rurales del Ecuador, debido a la falta de recursos o acceso a estos tratamientos convencionales. Estas terapias consisten en la aplicación de plantas medicinales, cauterización de las heridas con metales calientes, uso de las cenizas del tabaco, ácidos fuertes o cera caliente. Estos métodos no han sido estudiados por lo que su eficiencia no ha sido comprobada, pero se han podido identificar efectos adversos, como consecuencia de este tipo de prácticas ya que aparecen daños en la piel por quemaduras, se promueven las infecciones secundarias y quedan cicatrices más grandes y peores que las ocasionadas por la propia enfermedad (Calvopiña *et al.*, 2004, pp. 665, 668).

El tratamiento que se debe seguir dependerá del tipo de manifestación clínica de leishmaniasis que presenta la persona infectada (Satoskar y Durvasula, 2014, p. 81). Es necesario mencionar cuáles medicamentos son utilizados en cada caso de la enfermedad (ver tabla 2):

**Tabla 2.** Medicamentos utilizados para cada manifestación clínica de la leishmaniasis.

Manifestación Clínica	Medicamentos
<b>Leishmaniasis visceral</b>	Antimoniales pentavalentes, la Anfotericina B, la Pentamidina y la Miltefosina. Los dos últimos medicamentos se utilizan cuando los antimoniales pentavalentes no tienen efectos contra el parásito o cuando existe intolerancia por parte del paciente.
<b>Leishmaniasis mucocutánea</b>	Antimoniales pentavalentes y en última instancia la Pentamidina.
<b>Leishmaniasis cutánea</b>	Los mismos medicamentos que en el caso anterior pero se puede utilizar el ketoconazol.

Tomado de Abdi *et al.*, 1995, pp.6, 7



### 2.1.7.1 Tratamientos de primera línea

Los tratamientos de primera línea, como ya se mencionó anteriormente, son los antimoniales pentavalentes. Estos medicamentos son administrados por vía

parenteral por períodos amplios y son la opción más económica que existe en el mercado para tratar la leishmaniasis, según se menciona en el manual de diagnóstico y tratamiento detallado por el Ministerio de salud pública y bienestar social (2001).

Los antimoniales pentavalentes son utilizados desde el año 1912, y no fue sino hasta el año 1947 que se empezó a usar el primer medicamento que demostró ser eficiente en pacientes con leishmaniasis (el estibogluconato de sodio, Pentostam®) (Fig. 10b). Hasta la actualidad este medicamento y el antimonio de meglumina son utilizados como terapia principal en todos los casos de leishmaniasis como lo menciona Berman (1997, p. 689) y el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social en el Manual de diagnóstico y tratamiento (2001).

Los antimoniales pentavalentes presentan una respuesta eficiente y rápida frente a casos de leishmaniasis cutánea, aunque los síntomas no se normalizan por completo, pudiendo durar meses después de que el tratamiento haya concluido (Berman, 1997, p. 689). Durante muchas décadas estos medicamentos han sido la base para tratar esta enfermedad, sin embargo presentan una alta toxicidad y hay reportes que indican que los parásitos han empezado a generar resistencia (Satoskar y Durvasula, 2014, p. 81; Gutiérrez *et al.*, 2016, p. 154). Estos compuestos empiezan a tener efecto en el organismo cuando se reducen a su forma trivalente, y actúan específicamente sobre la forma amastigote, inhibiendo la tripanotión reductasa, enzima responsable de regular el estrés oxidativo en el parásito. Como consecuencia de esto, se inhibe la actividad glicolítica y se reduce la generación de guanidina y ATP. La efectividad y la especificidad de estos medicamentos radica en que, a diferencia de las células humanas, la *Leishmania* utiliza tripanotión y no glutatión, además, los macrófagos son capaces de almacenar los antimoniales permitiendo que el medicamento actúe de manera más prolongada contra los parásitos según se evidencia en el Manual de diagnóstico y tratamiento detallado por el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (2001).

Entre los efectos secundarios que pueden presentar estos medicamentos se encuentran: dolores de cabeza, articulares, musculares, abdominales; pérdida

de apetito, fiebre, mareos, náuseas, vómitos y erupciones en la piel, entre otros, además hay reportes de: cardiotoxicidad, aunque esta se produce con menor frecuencia que los síntomas anteriores según lo detallado en el Manual de diagnóstico y tratamiento escrito por el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (2001).

## **2.1.7.2 Tratamientos de segunda línea**

### **2.1.7.2.1 Pentamidina**

Es una diamina aromática (Fig. 10c) utilizada para el tratamiento de la leishmaniasis cuando los antimoniales pentavalentes han dejado de ser efectivos debido a la resistencia del parásito (Singh, Kumar y Singh, 2012, p. 488). Sin embargo, se ha reportado que el parásito también suele generar resistencia a este medicamento tras un corto período de exposición. No se conoce su mecanismo de acción exacto, sin embargo, estudios previos han demostrado que la pentamidina se une al surco menor del DNA e inhibe la topoisomerasa II, afecta la biosíntesis de poliaminas e inhibe el complejo II en la cadena respiratoria (Polonio y Efferth, 2008, p. 279). Debido a que la eficacia de este medicamento ha ido decayendo, la resistencia que presenta el parásito y los efectos secundarios que existen, su empleo ha sido prohibido en algunas partes del mundo, como en la India (Singh *et al.*, 2012, p. 488).

Entre los efectos secundarios reportados se encuentran: hipoglicemia, hipotensión, nefrotoxicidad, mialgias, dolor en el lugar de la inyección, taquicardia, sabor a metal, náuseas, dolores de cabeza, adormecimiento, entre otros. Estos efectos secundarios se presentan cuando se administran bajas dosis en el paciente, lo que no descarta que pudieran existir otros problemas o agravarse los antes mencionados cuando se usan dosis más altas y tiempos de tratamiento más prolongados. Debido a esto, la pentamidina no es recomendada para pacientes con leishmaniasis visceral (Singh y Sivakumar, 2004, p. 309).

### 2.1.7.2.2 Anfotericina B

Es una macrolactona que tiene actividad antifúngica y leishmanicida (Fig. 10d). Se obtiene a partir del actinomiceto *Streptomyces nodosus* y se utiliza cuando el parásito ha generado resistencia contra los medicamentos de primera línea y la pentamidina (Abdi *et al.*, 1995, pp. 17, 18). Según el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (2001) en el Manual de diagnóstico y tratamiento, debido a que es un medicamento altamente tóxico, se recomienda que su administración sea efectuada por personal capacitado en ambiente hospitalario, de tal forma que se pueda controlar cualquier efecto adverso.

El mecanismo de acción se basa en la unión de la anfotericina con el ergosterol de la membrana celular, lo que provoca su deterioro. Este mecanismo genera la formación de poros en la membrana del parásito y se eliminan electrolitos como el potasio, lo que conduce a la muerte celular (Mohapatra, 2014, p. 5). También se atribuye su muerte al daño oxidativo (Abdi *et al.*, 1995, p. 17; Mohapatra, 2014, p. 5). Se menciona que este medicamento es altamente tóxico debido a que también se une al colesterol, principal esteroide presente en las membranas celulares del ser humano como se evidencia en el Manual de diagnóstico y tratamiento (Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, 2001).

En el mercado se pueden encontrar varias formulaciones del medicamento, entre las más destacadas se encuentra la anfotericina B (Fig. 10d) y anfotericina B liposomal, esta última es mejor asimilada y tolerada por el cuerpo, y es menos tóxica para el organismo (Mohapatra, 2014, p. 5).

Este fármaco presenta un rango amplio de efectos secundarios, entre los cuales se encuentran: fiebre y escalofríos (frecuentes luego de unas pocas horas de ser administrado el medicamento), dolor de espalda, náuseas, vómitos, calambres estomacales, nefrotoxicidad, trombocitopenia transitoria, anemia, disminución de la función renal, hipopotasemia, hiporexia, cambios del comportamiento, y menos frecuente, una reacción anafiláctica; como se detalla en el informe de la reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis (2010), Abdi *et al* (1995, p. 19) y en el Manual de diagnóstico y tratamiento

emitido por el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (2001).

### **2.1.7.2.3 Otros**

Existen otros medicamentos alternativos que han sido utilizados en casos de leishmaniasis como la Paromomicina (Aminosidina), un aminoglucósido usado como antibiótico en el tratamiento de infecciones intestinales (Berman, 1997, p. 694). Este medicamento ha demostrado tener pocos efectos secundarios, alta eficacia eliminando al parásito y su administración se realiza en un intervalo de tiempo menor. En estudios de su mecanismo de acción se ha encontrado que inhibe la síntesis proteica (Mohapatra, 2014, p. 6).

Los agentes orales han demostrado ser eficaces como tratamiento para la leishmaniasis cuando se los administra en terapias combinadas, sin embargo cuando se pretende tratar pacientes con leishmaniasis cutánea que se encuentran en sus primeras etapas, se puede utilizar este medicamento como monoterapia con el fin de curar de manera más eficiente y rápida la enfermedad. A pesar de que este tipo de medicamentos son los menos efectivos, son también los que menos toxicidad provocan en los pacientes (Berman, 1997, pp. 695-696).

Entre estos fármacos se encuentran:

- Miltefosina (Impavido®): según lo escrito en el Manual de diagnóstico y tratamiento detallado por el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (2001), a este medicamento se lo considera como un medicamento de tercera opción en el tratamiento de leishmaniasis cutánea y mucocutánea. Es un medicamento apto para pacientes cardíacos pero debe ser administrado bajo vigilancia puesto que el medicamento puede provocar hepatotoxicidad. Este constituye el primer medicamento que se administra por vía oral que resulta en una tasa del 94% de cura de la leishmaniasis visceral, y se ha demostrado que altera el metabolismo alquilo-lipídico del parásito, lo que provoca apoptosis y por ende la muerte del mismo (Mohapatra, 2014, p. 6).

- **Azoles:** entre los azoles que han demostrado ser efectivos contra la *Leishmania spp.* se encuentran el ketoconazol, el fluconazol e el itraconazol. Estos medicamentos son antifúngicos, sin embargo, han demostrado ser eficientes leishmanicidas y hoy en día se los utiliza como una alternativa oral para tratar la leishmaniasis cutánea. El mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima del citocromo P450 e interrumpe la biosíntesis del ergosterol. Esto ocasiona una alteración en la integridad de la membrana, la permeabilidad y no permite la correcta desintoxicación de las células (Gupta, Daigle y Floey, 2015, p. 326; Gaudiano, Valderrama, Cárdenas, 2015, p. 226).
- **Allopurinol:** inhibe el catabolismo de las purinas en las células de mamíferos y el anabolismo de las purinas en la *Leishmania*. Se utiliza en pacientes con leishmaniasis cutánea (Singh y Sivakumar, 2004, p. 311).

Los agentes locales fueron diseñados para tratar la leishmaniasis cutánea. Entre sus ventajas se encuentran su fácil administración, la cual se puede realizar de manera ambulatoria, y tanto la toxicidad como la absorción del fármaco en la circulación sistémica son mínimas. Los principales problemas de estos tratamientos radican en que la leishmaniasis cutánea no es una enfermedad superficial, y se produce porque la forma amastigote reside en la dermis y en algunos casos logra diseminarse hacia el sistema linfático y las membranas de la mucosa. Debido a esto, para que los agentes locales tengan un efecto beneficioso deben infiltrarse en lo profundo de la lesión y la enfermedad no debe haberse distribuido por todo el organismo (Berman, 1997, pp. 696-697).

### **2.1.7.3 Nuevas investigaciones**

Desde hace varios años han emergido investigaciones cuya finalidad consiste en reemplazar las terapias existentes, debido a todos los problemas que ocasionan los medicamentos antes mencionados. Lo que se persigue es que se puedan administrar por vía no parenteral, tiempos más cortos de administración, toxicidad baja o nula y que sean más efectivos para combatir al parásito

(Berman, J., 1997, p. 684). Otro enfoque que se puede desarrollar es la identificación y descubrimiento de genes de interés, para desarrollar nuevos medicamentos que eliminen o inhiban los productos de los mismos. Con este fin se puede emplear la bioinformática para identificar genes o familias de genes que codifican para proteínas cuyas funciones sean conocidas y puedan ser consideradas como posibles blancos terapéuticos (Bañuls *et al.*, 2007, p. 62).

Entre los medicamentos nuevos que ya se encuentran en etapas avanzadas de investigación podemos encontrar: el sustituto de la 2-quinolina, medicamento derivado de plantas que ha demostrado tener una actividad contra la *Leishmania* tanto en pruebas *in vitro* como *in vivo*. La 8-aminoquinolina, medicamento que se encuentra en pruebas de fase II como leishmanicida, causa la muerte del parásito mediante la fragmentación de la cromatina, la producción elevada de diversas especies reactivas de oxígeno y la elevación del calcio intracelular (Mohapatra, 2014, p. 6).

### **2.1.8 Prevención**

La principal estrategia para prevenir el contagio de la leishmaniasis consiste en la identificación de los grupos de riesgo y en la eliminación de los factores que favorecen la picadura de la mosca y favorecen la transmisión de la enfermedad. Entre estos factores se encuentran: la agricultura, las actividades mineras, el ingreso de militares y la caza en zonas de riesgo (De Vries y Reedjik, 2015, p. 105). Si la enfermedad ya empezó su curso, es importante la detección temprana y su posterior tratamiento, así como también tener un control adecuado de los animales considerados como huéspedes. El control de los vectores se logra mediante el uso de insecticidas de acción residual, es decir, que permanecen más tiempo activos y logran eliminar a las *Lutzomyias* de manera más eficiente, ya que aún son bastante sensibles a los mismos (Desjeux, 2004, pp. 310-311).

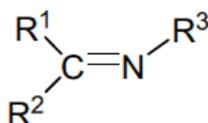
Otra medida necesaria, la más efectiva y rentable, es la educación a la población. Se debe explicar a las personas residentes en zonas endémicas que deben

reducir al máximo el riesgo de las picaduras de los flebótomos, tomando para ello las debidas precauciones, como por ejemplo: usar la vestimenta adecuada, usar repelentes, colocar mosquiteros cuyas aberturas sean al menos tres veces menores que la del tamaño de los flebótomos y de preferencia que estén impregnados con insecticidas (De Vries y Reedjik, 2015, pp. 105-106).

En los últimos años se han realizado esfuerzos importantes en la investigación y desarrollo de vacunas contra la leishmaniasis, ya que esta sería la solución ideal para llegar a erradicar esta enfermedad (De Vries y Reedjik, 2015, p. 107).

## 2.2 Bases de Schiff

Fueron sintetizadas por primera vez en 1864 por Hugo Schiff, y nombradas así en su honor. Las bases de Schiff, también conocidas como azometinos o iminas, son compuestos orgánicos de fórmula general  $R_1R_2C=NR_3$  (Fig. 11) que se forman cuando una amina primaria reacciona con una cetona o un aldehído (Da Silva *et al.*, 2011, p. 1; Perentena, González, Celis, Valbuena y Colina, 2015, p. 6).



**Figura 11.** Estructura general de una base de Schiff o imina.  
Tomado de da Silva *et al*, 2011, pp. 2.

En las iminas  $R_3$  puede ser un arilo, alquilo o heterociclo, mientras que  $R_1$  y  $R_2$  pueden ser un heterociclo, alquilo, arilo o hidrógeno (Qin, Long, Panunzio y Biondi, 2013, p. 12267). Cuando  $R_1$  es un alquilo o arilo y  $R_2$  es un hidrógeno estos compuestos se llaman aldiminas, mientras que si ambos  $R_1$  y  $R_2$  son alquilos o arilos reciben el nombre de cetiminas (Layer, 1966, p. 489), siendo las bases de Schiff uno de los subgrupos importantes de las cetiminas. Estos

compuestos presentan una amplia gama de actividades biológicas (Kajal *et al.*, 2013, p. 1) entre las que se incluyen: actividad antibacterial, antimalárica, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria (Da Silva *et al.*, 2011, p. 1), analgésica, antihelmíntica, anticonvulsiva, antitubercular, anticancerígena, antioxidante, herbicida (Kajal *et al.*, 2013, p. 1), antidepresiva y anti degenerativo (Azam, Singh, Khokhra y Prakash, 2007, pp. 446, 447). Además se ha reportado su actividad contra la infertilidad, poseen propiedades antipiréticas, actividad sinérgica con los insecticidas y pueden actuar como reguladores en el crecimiento de las plantas (Kumar *et al.*, 2009, p. 292). Otros usos reportados son como: catalizadores, intermediarios en síntesis orgánica (Kajal *et al.*, 2013, p. 1), estabilizadores de polímeros, inhibidores de corrosión, y para la obtención de pigmentos y colorantes (Da Silva *et al.*, 2011, p. 1). Estas iminas se encuentran presentes en diversos compuestos ya sean naturales o sintéticos y se ha demostrado que muchas de sus actividades biológicas se deben a la presencia de estos mismos grupos (Kajal *et al.*, 2013, p. 1).

### 2.2.1 Síntesis

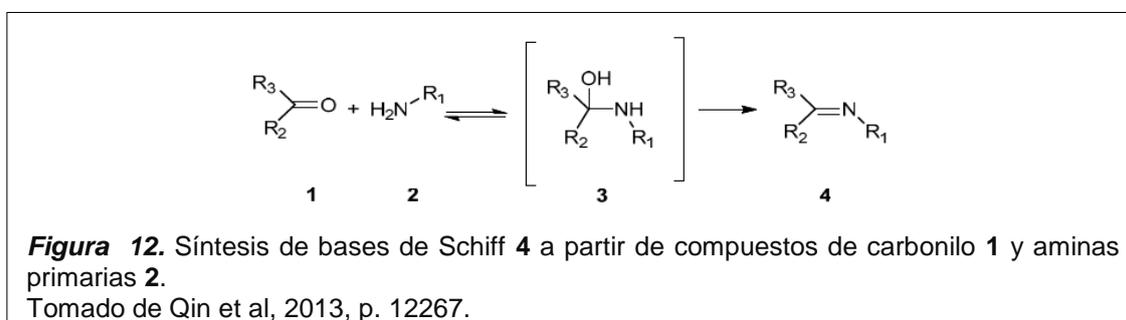
Existen diferentes rutas sintéticas para la obtención de bases de Schiff, entre las más importantes tenemos:

- **Condensación de aldehídos o cetonas con aminas primarias**

Desde el siglo XIX se han descrito varios métodos para la síntesis de estos compuestos. El método clásico, y el más usado, se basa en la condensación de una cetona o un aldehído **1** con una amina primaria **2** para formar una carbinolamina **3** la cual luego de eliminar el agua forma la imina **4** (Fig. 12). La eliminación del agua de la reacción es importante ya que esta reacción es reversible, y para esto se puede usar una destilación azeotrópica, un agente desecante (tamices moleculares), o solventes deshidratantes, como el ortoformiato de trimetilo o el ortosilicato de tetrametilo. Este método es más

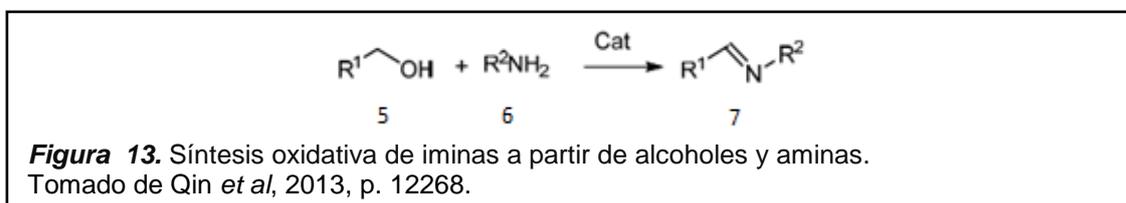
efectivo cuando las aminas son altamente nucleofílicas y a su vez, los compuestos carbonilo son altamente electrofílicos (Da Silva *et al.*, 2011, p. 2).

Una innovación que destaca, es aquella en la que se utiliza irradiación de microondas. Esta es una técnica relativamente simple, presenta una gran selectividad, la reacción logra tener una mayor eficiencia en un periodo corto y ocasiona un daño medioambiental menor que otras técnicas descritas. Para implementarla no se necesitan cantidades grandes de solventes aromáticos y se elimina el aparato de Dean-Stark para la remoción azeotrópica de agua (Da Silva *et al.*, 2011, p. 2).



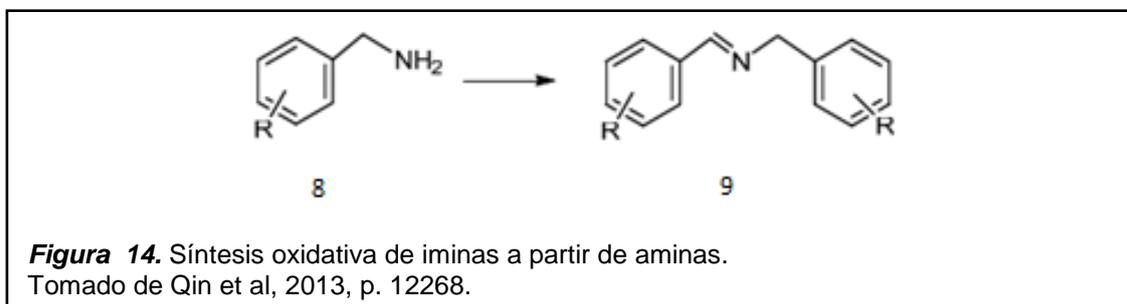
- **Oxidación aeróbica**

Es un método nuevo, por el cual se preparan iminas **7** a partir de aminas **6** y alcoholes **5** por medio de procesos oxidativos en tándem (Fig. 13) (Qin *et al.*, 2013, p. 12268). En esta reacción se obtiene el compuesto de carbonilo *in situ* el cual se condensa con la amina tal como se indicó en el punto anterior.



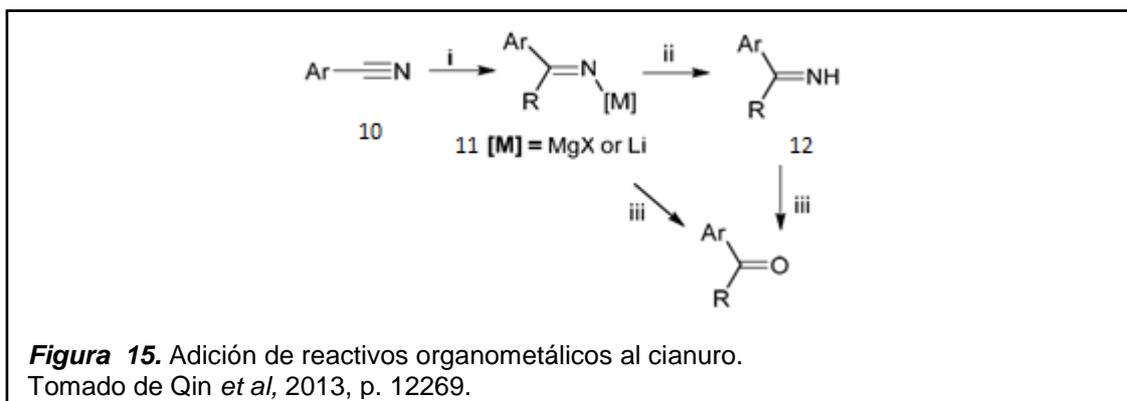
Así mismo, se desarrolló un método más eficiente siguiendo el mismo enfoque, a partir de la oxidación de una amina **8** para la obtención de iminas **9** (Fig. 14) (Qin *et al.*, 2013, p. 12268), utilizando como oxidantes al aire, oxígeno puro o peróxido de hidrógeno, catalizados mediante luz, generadores de radicales

libres, o diferentes catalizadores metálicos, entre otros (Largeron, 2013, pp. 5226, 5228).



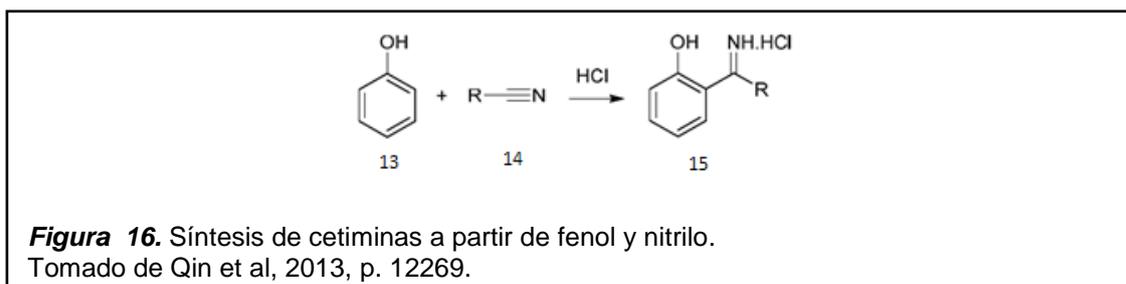
- **Adición de reactivos organometálicos a nitrilos**

La adición de reactivos Grignard u organolitios al cianuro de arilo o alquilo (**10**) permite obtener cetiminas no sustituidas **12** o cetonas dependiendo de las condiciones de hidrólisis utilizadas para descomponer la metaloimina intermediaria **11** (Fig. 15) (Qin et al., 2013, p. 12268).



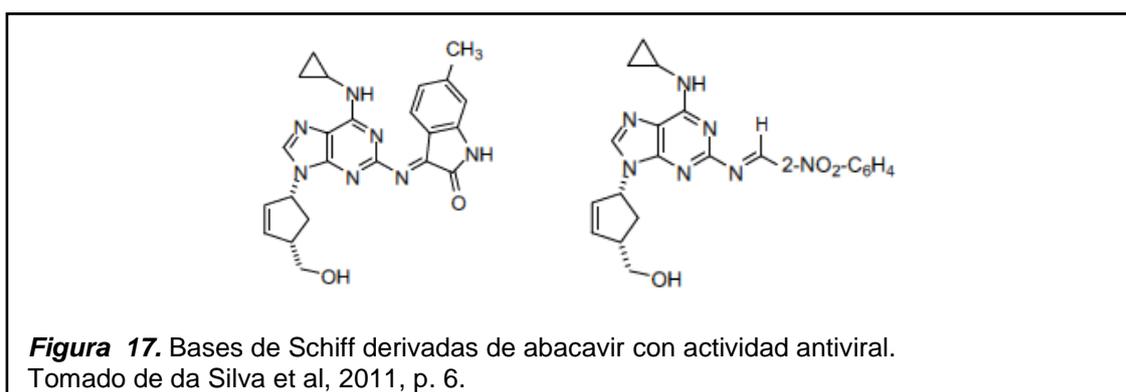
- **Reacción de fenoles y fenol éteres con nitrilos**

Esta reacción permite obtener cetiminas **15** con alto rendimiento, para esto se mezcla el nitrilo **14** con fenol (**13**) o éter y se satura la solución con HCl (g) o se usa ZnCl<sub>2</sub> cuando los fenoles son poco reactivos (Fig. 16) (Qin et al., 2013, p. 12269).

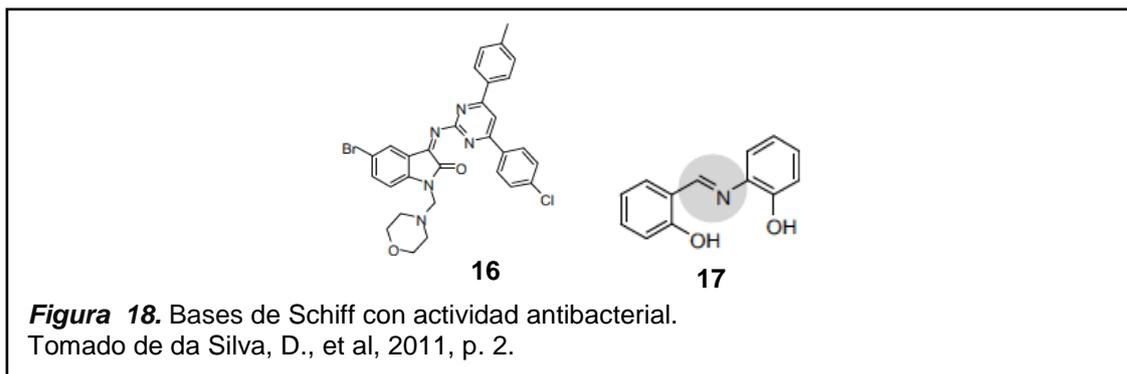


## 2.2.2 Actividades biológicas de diferentes bases de Schiff

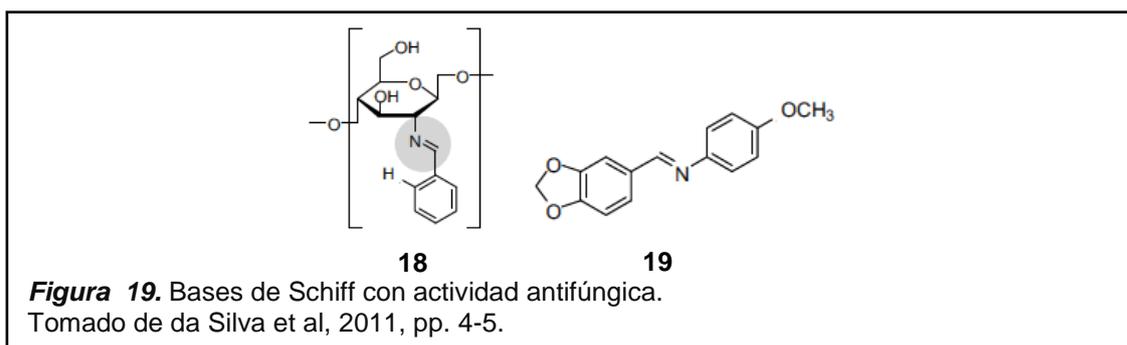
- **Actividad antiviral:** las bases de Schiff derivadas de abacavir (Fig. 17) son consideradas como profármacos de abacavir, estos compuestos son efectivos contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo I (Da Silva *et al.*, 2011, p. 6).



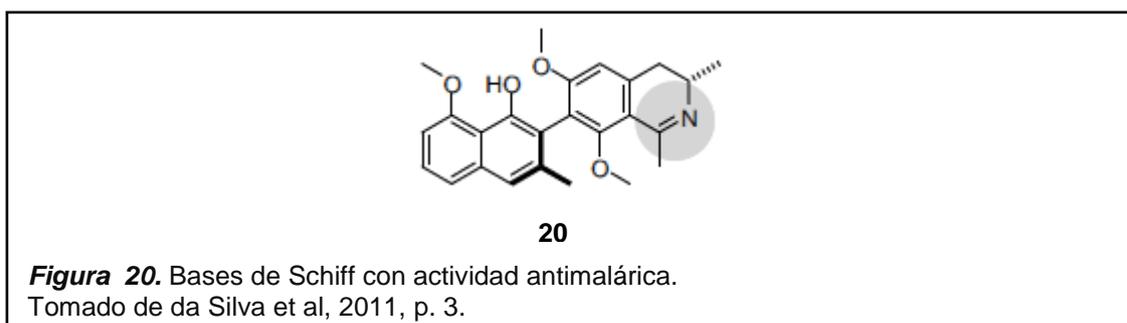
- **Actividad antibacterial:** algunas bases de Schiff derivadas de Isatín **16** han mostrado actividad antibacterial contra algunas bacterias de interés clínico como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Enterococcus faecalis*. Así como *N*-(saliciden)-2-hidroxianilina (**17**) que demostró ser efectivo contra *Mycobacterium tuberculosis* (Fig. 18) (Da Silva, *et al.*, 2011, p. 2).



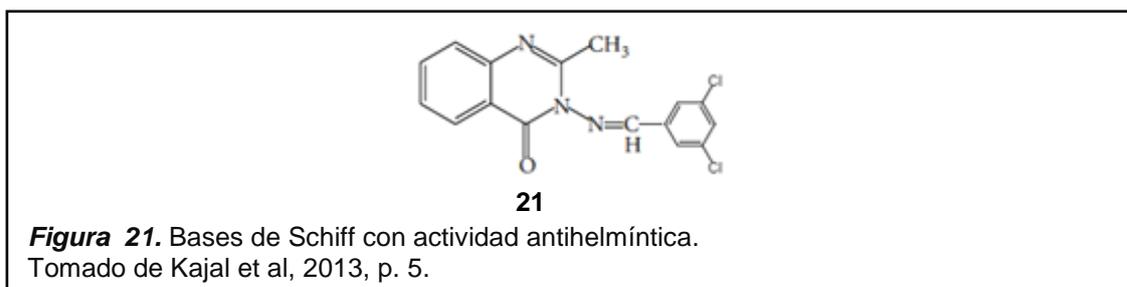
- **Actividad antifúngica:** algunas bases de Schiff derivadas del quitosano **18** presentan actividad antifúngica así como algunas bases de Schiff derivadas de piperonil **19** han sido efectivas frente a *Trychophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* (Fig. 19) (Da Silva et al., 2011, pp. 3-4).



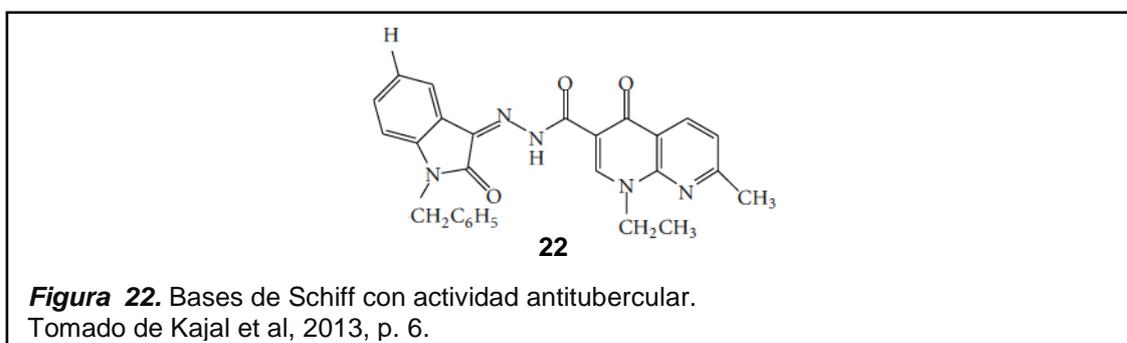
- **Actividad antimalárica:** bases de Schiff como la ancistrocladidina (**20**) han demostrado tener un efecto contra el protozoo *Plasmodium falciparum* (Fig. 20) (Da Silva et al., 2011, p. 2).



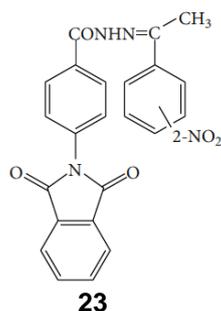
- **Actividad antihelmíntica:** una serie de bases de Schiff que contienen 4 (3H)-quinazolina en su estructura, han mostrado moderada actividad antihelmíntica frente a *P. posthuma* y de estos, el compuesto **21** ha mostrado una alta actividad antihelmíntica (Fig. 21) (Kajal *et al.*, 2013, p. 4).



- **Actividad antituberculosa:** se ha especificado que una de las bases de Schiff derivadas del indolin-2,3-diona y carbohidrazidas del ácido nalidixico **22** (Fig. 22), presentan actividad antituberculosa contra las cepas *Mycobacterium cheleneo*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacteriu, intracclulave* (Kajal *et al.*, 2013, p. 4).

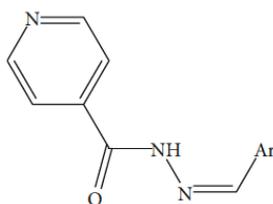


- **Actividad anticonvulsiva:** una serie de bases de Schiff de 4-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-isoindol-2-il)-N'-fenil metiliden o fenil etiliden benzohidrazidas sustituidas **23** (Fig. 23), han mostrado actividad anticonvulsiva y han sido menos tóxicas que la fenitoína usada como tratamiento estándar (Kajal *et al.*, 2013, p. 7).



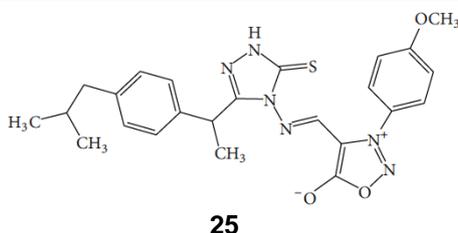
**Figura 23.** Bases de Schiff con actividad anticonvulsiva.  
Tomado de Kajal et al, 2013, p. 7.

- **Actividad antidepresiva:** estudios *in vivo* muestran que bases de Schiff derivadas de la hidracida del ácido isonicitínico **24** (Fig. 24) presentan una significativa actividad antidepresiva (Kajal *et al.*, 2013, p. 7).



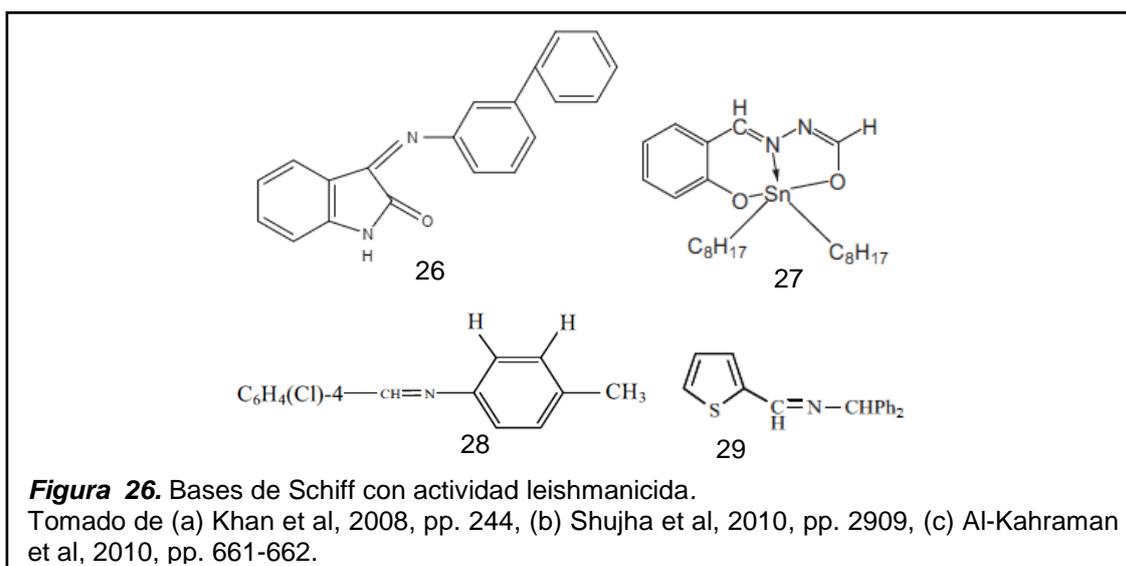
**Figura 24.** Bases de Schiff con actividad antidepresiva.  
Tomado de Kajal et al, 2013, p. 7.

- **Actividad analgésica y anti-inflamatoria:** bases de Schiff de estructura **25** derivadas de sidnona (Fig. 25) exhiben buenas propiedades analgésicas y antiinflamatorias (Kajal *et al.*, 2013, p. 7).



**Figura 25.** Bases de Schiff con actividad analgésica y anti-inflamatoria.  
Tomado de Kajal et al, 2013, p. 8.

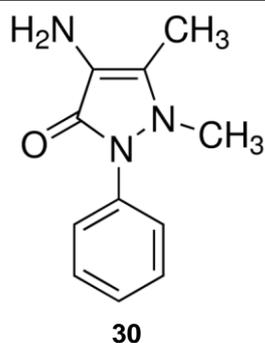
- Actividad leishmanicida:** Según estudios *in vitro* realizados por Khan *et al.* (2008, pp. 245-246) algunas bases de Schiff derivadas de Isatín, tal como la 3-(fenilimino)-1*H*-indole-2-ona **26**, poseen un rango variable de actividad leishmanicida. Así mismo en un estudio efectuado por Shujha *et al.* (2010, pp. 2904, 2908-2909), los compuestos dibutiltinestaño (IV) [N-(2-oxidobenziliden)-*N'*-(oxidometileno) hidracina] y dietilestaño (IV) [N-(2-oxidobenziliden)-*N'*-(oxidometileno) hidracina] **27** han demostrado ser buenos candidatos para eliminar los promastigotes de la *Leishmania*. Al-Kahraman, Madkour, Ali y Yasinzai (2010, p. 665) demostraron que algunos azometinos **28** presentan actividad leishmanicida frente a *Leishmania major* mientras que estudios realizados por Al-Kahraman, Singh y Yasinzai (2011, p. 491) probaron que algunos arilazometrininos de la clase de *N*-(2-tieniliden) aminas **29** con diferentes sustituciones presentan una significativa respuesta contra estos parásitos (Fig. 26).



### 2.2.3 Bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina

La 4-amino-1,5-dimetil-2-fenilpirazol-3-ona (**30**), una pirazolona también conocida como 4-aminoantipirina (Fig. 27), es una lactama de 5 miembros derivada del pirazol. El nombre de antipirina que tiene este tipo de compuestos

fue acuñado por Knorr debido a la propiedad antipirética que exhibe. Bases de Schiff derivadas de **30** han sido obtenidas, en su mayoría, por medio de la condensación de esta amina con aldehídos en soluciones acuosas o alcohólicas (Raman, Johnson y Sakthivel, 2009, pp. 693-694). Estos compuestos han sido objeto de estudio por las diferentes propiedades que presentan, y han sido empleados para generar compuestos fluorescentes, diferentes catalizadores, agentes quimioterapéuticos (Jeyanthi, Livingston y Sheela, 2014, p. 307), y han demostrado poseer un rango amplio de actividades biológicas entre las que se encuentran: actividad analgésica, antiviral, antimicrobiana, antifúngica (Shoaib, Rahman, Ali y Naveed, 2015, p. 332), antiinflamatoria, antipirética, antirreumática (Alam, Choi y Lee, 2012, p. 4103), antioxidante (Alam y Lee, 2011, p. 93), antitumoral (Marković *et al.*, 2010, p. 18) entre otras.

**30**

**Figura 27.** Estructura química de la 4-aminoantipirina.  
Tomado de Kolliopoulos, Kampouris y Banks, 2015, p. 3245.

### 3 CAPÍTULO III. Metodología

#### 3.1 Cultivo del estado promastigote del parásito *Leptomonas*.

Para cumplir los objetivos trazados en este trabajo de titulación, primeramente se empleó el parásito *Leptomonas* de referencia MHOM/B2/82/BEL-21. Esta cepa se mantiene de forma rutinaria en el Centro de Investigación Traslacional (CIT) de la Universidad de las Américas (UDLA).

La fase promastigote de *Leptomonas* se mantuvo mediante pases secuenciales de cultivos de 7 días en medio fresco BHI (Bacto Brain Heart Infusion) (Sigma-Aldrich, EE.UU, 53286) suplementado con Hemina (Hemin Chloride) (Calbiochem®, Merck Millipore, EE.UU, 3741) y 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado (Fetal Bovine Serum, Eurobio, Francia, CVFSVF06-01) y 1% de penicilina-estreptomicina 5000 U/mL (Penicillin-Streptomycin, Thermofisher Scientific EE.UU, 15070-063). Cada pase se realizó en una relación 1:14 (parásitos: medio) y se mantuvo a una temperatura de 27°C en frascos de cultivo de 25 mL (Graziose *et al.*, 2012, p. 457).

#### 3.2 Cultivo del estado promastigote del parásito *Leishmania mexicana*

Por otra parte se trabajó con el parásito *Leishmania mexicana* de referencia LM379. Esta cepa fue donada por la Universidad Cayetano Heredia (Lima-Perú) y se la mantiene de forma rutinaria en el CIT de la UDLA.

La fase promastigote de *L. mexicana* se mantuvo mediante pases secuenciales de cultivos de 4 días en medio Schneider de Drosophila (1X) (SDM) (Schneider's Drosophila Medium; Gibco®, Thermofisher Scientific, EE.UU, 21720-024) que contiene L-glutamina y bicarbonato de sodio. El medio se suplementó con 20% de FBS inactivado y 1% de penicilina-estreptomicina. Cada pase se realizó en una relación 1:2 (parásitos: medio) y se mantuvo a una temperatura de 24°C en

frascos de cultivo de 25 mL (Oliviera *et al.*, 2011, p. 2377; Mentink y Moseer, 2001, p. 1142).

### **3.3 Cultivo de macrófagos murinos inmortalizados derivados de médula ósea**

En otro grupo de experimentos se trabajó con macrófagos murinos inmortalizados derivados de médula ósea que fueron donados por Cherylin M. Sirois PhD del laboratorio de Eicke Latz, MD, PhD de la Universidad de Bonn Alemania y se las mantiene de forma rutinaria en el CIT de la UDLA.

Los macrófagos se mantuvieron mediante pases secuenciales de cultivos de 4 días en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco®, Thermofisher Scientific, EE.UU, 21063029) modificado con alto contenido de glucosa, que contiene L-glutamina y HEPES. El medio se suplementó con 10% de FBS inactivado y 1% de penicilina-estreptomina. Cada pase se realizó en una relación 0.5:10 (células: medio) y se mantuvieron a una temperatura de 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 18% de O<sub>2</sub> en frascos de cultivo de 75 mL (Graziose *et al.*, 2012, p. 458).

### **3.4 Cultivo del estado amastigote intracelular del parásito *Leishmania mexicana***

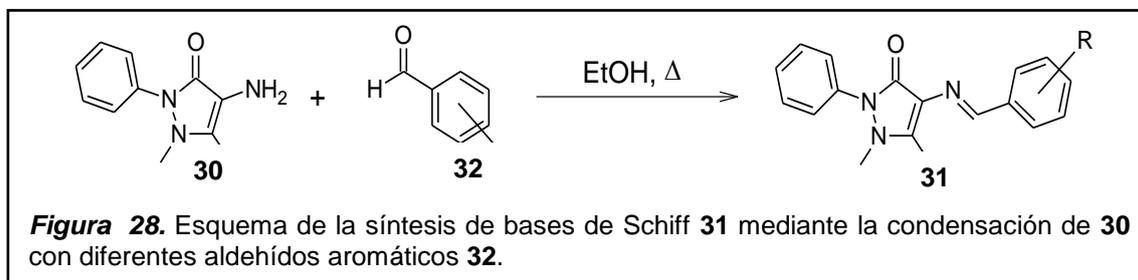
Para poder infectar los macrófagos, los parásitos deben encontrarse en su fase infectiva (promastigotes metacíclicos), para conseguirlo, se cambiaron las condiciones del medio, tratando de que sean iguales a las que se encuentran en la probóscide del vector. Con este objetivo, se acidificó el medio SDM agregando HCl 1M hasta llegar a un pH de 5.4 y se dejó incubar por 3 días a 24°C (Bates y Tetley, 1993, p. 194).

En placas de 6 pocillos (Costar®, Corning, EE.UU, 3516) se sembró una densidad de células de  $1,5 \times 10^6$  células/pocillo 14 horas antes de la infección en las condiciones antes mencionadas. Transcurrido este intervalo de tiempo se realizaron dos lavados con PBS (Phosphate Buffered Saline; Gibco®, Thermofisher Scientific, EE.UU, 10010-023) y se procedió a realizar el conteo de los parásitos en una cámara de Neubauer, la densidad se ajustó con medio RPMI 1640 (1X) (Roswell Park Memorial Institute; Gibco®, Thermofisher Scientific, EE.UU, 22400-089) suplementado con 20% FBS y 1% de penicilina-estreptomicina, estableciendo una relación 1:10 (macrófagos: parásitos) por pocillo. Se añadieron los promastigotes metacíclicos a los pocillos con células y se incubó a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 18% de O<sub>2</sub> por 2 horas (Oliviera *et al.*, 2011, p. 2378).

### 3.5 Bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina

#### 3.5.1 Síntesis

Las bases de Schiff **31** que se probaron en este proyecto de titulación fueron sintetizadas previamente por el investigador de la Universidad de las Américas Jorge Heredia PhD, mediante la condensación directa de la 4-aminoantipirina (**30**) con los respectivos aldehídos aromáticos **32** usando etanol como solvente (Alam, Choi y Lee, 2012, pp. 4103-4104), tal como se muestra en la figura 28.



### 3.5.2 Concentraciones de bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina

Los compuestos en cuestión se disolvieron en dimetil-sulfóxido (DMSO) (Calbiochem®, Merck Millipore, EE.UU, 67-68-5), fueron filtrados con filtros de polipropileno con poros de 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro (Nalgene™, Thermofisher Scientific, EE.UU, 725-2520), alicuotados y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En la tabla 3 se pueden observar las concentraciones de las soluciones stock usadas para la determinación de la actividad leishmanicida y citotóxica de los compuestos **LD1-LD12**, las cuales estuvieron limitadas por la solubilidad de los compuestos en el solvente utilizado; mientras que en la tabla 5 se muestran las concentraciones usadas para la determinación del  $\text{IC}_{50}$  de los compuestos **LD8** y **LD12**.

**Tabla 3.** Bases de Schiff utilizadas con las respectivas concentraciones de las soluciones madre.

Código	Concentración final por pocillo de la Sol. Stock [ $\mu\text{M}$ ]	
	Ensayos actividad antiparasitaria	Ensayos actividad leishmanicida y citotóxica
<b>LD1</b>	858,0	429,0
<b>LD2</b>	813,4	406,7
<b>LD3</b>	529,2	264,6
<b>LD4</b>	741,0	370,5
<b>LD5</b>	741,0	370,5
<b>LD6</b>	761,8	380,9
<b>LD7</b>	888,0	444,0
<b>LD8</b>	787,7	393,8
<b>LD9</b>	773,2	386,6
<b>LD10</b>	375,6	187,8
<b>LD11</b>	239,2	119,6
<b>LD12</b>	709,5	354,8

Nota: el compuesto **LD5** no se pudo disolver completamente en DMSO por lo que se decidió utilizarlo en suspensión.

**Tabla 4.** Concentraciones utilizadas para la determinación del IC<sub>50</sub>.

Código	Concentración final por pocillo [ $\mu$ M]		
	Ensayos actividad antiparasitaria	Ensayos actividad leishmanicida	Ensayos citotoxicidad
LD8	787,7	393,8	196,9
	708,9	315,1	157,5
	630,2	236,3	98,6
	551,4	189,0	78,8
	472,6	157,5	49,5
	393,8	126,0	39,4
	315,1	78,8	19,7
	236,3	39,4	9,8
	157,5	19,7	
	78,8	9,8	
	39,4		
19,7			
LD12	709,5	354,8	177,4
	638,6	283,8	147,6
	567,6	212,9	88,8
	496,7	147,6	70,95
	425,7	70,95	44,6
	354,8	35,5	35,5
	283,8	17,7	17,7
	212,9	8,9	8,9
	147,6		
	71,0		
	35,5		
17,7			

### 3.6 Determinación de la actividad leishmanicida de los compuestos

Se recolectaron los parásitos del medio de cultivo en su fase logarítmica de crecimiento (4 días tras el pase), se contaron en una cámara de Neubauer y se ajustó la densidad de los mismos a  $1.0 \times 10^7$  parásitos/mL con medio SDM. Se adicionaron 100 $\mu$ L de la suspensión de parásitos en una micro placa de 96 pocillos de fondo plano a la cual se agregó 1  $\mu$ L de la solución stock de cada compuesto (ver tabla 3), los pocillos restantes se emplearon para los diferentes controles del experimento. Como controles negativos se emplearon: los

parásitos sin tratamiento y con DMSO al 1%, y el control positivo fue la pentamidina [100 µg/mL] (Sigma-Aldrich, EE.UU, P0457). Las placas se dejaron incubar por 48 horas a 24°C (Brenzan *et al.*, 2007, p. 717).

Se realizó el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol o también denominado como ensayo de MTT. Se disolvieron 5 mg de MTT en 1 mL de Solución Hank (1X) (Gibco®; Thermofisher Scientific, EE.UU, 14185052), y se esterilizó usando un filtro de polipropileno de 0,2 µm (Nikzad, S., Baradaran, M., y Nasri, P., 2014, p. 432). Una vez transcurrido el intervalo de tratamiento con los compuestos se agregó MTT al 5% al volumen final de cada pocillo y se incubó por 4 horas protegiendo las placas de la luz. Tras la incubación se detuvo la reacción con 100µL de una solución al 25% de dodecil sulfato de sodio (SDS) (UltraPure™, Thermofisher Scientific, EE.UU, 15525-017) en 2-propanol (Sigma-Aldrich, EE.UU, 270490) al 50%; se homogenizó la mezcla y se dejó incubar por 20 minutos a temperatura ambiente. La lectura de la absorbancia se realizó en un lector de microplacas multi detección (Synergy™HT, BioTek) a 570nm y 630nm (Dutta, Mandal, Mandal y Chatterjee, 2007, p. 83; Graziose *et al.*, 2012, p. 458).

El cálculo del porcentaje de viabilidad se realizó empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra} - \text{Absorbancia del blanco}}{\text{Absorbancia control} - \text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

**(Ecuación 1)**

Sun *et al.*, 2014, p. 1055.

### **3.7 Determinación de la actividad citotóxica de las bases de Schiff frente a macrófagos murinos inmortalizados derivados de médula ósea**

Para determinar la actividad citotóxica de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina frente a macrófagos murinos inmortalizados derivados de la

médula ósea se recolectaron los macrófagos con la ayuda de un raspador de células de 23 cm (Nunc™, Thermofisher Scientific, EE.UU, 179693), y se contaron en una cámara de Neubauer teñidos con Trypan Blue (Sigma-Aldrich, EE.UU, 93595), con el objetivo de discriminar las células vivas de las muertas, la densidad celular se ajustó a  $5 \times 10^4$  células/ mL con medio DMEM.

La suspensión celular se sembró en un volumen final de 200  $\mu$ L en micro placas de 96 pocillos de fondo plano y se agregaron 2  $\mu$ L de la solución stock de cada compuesto por pocillo (ver tabla 3) el resto de los pocillos se empleó para los diferentes controles del experimento. Como controles negativos se emplearon los macrófagos sin tratamiento y los macrófagos tratados con DMSO al 1%, y como controles positivos, macrófagos tratados con pentamidina y macrófagos tratados con podofilotoxina [10  $\mu$ M] (Sigma-Aldrich, EE.UU, P4405). Las células se dejaron incubar por espacio de 48 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 18% de O<sub>2</sub> (Graziose *et al.*, 2012, p. 458).

Transcurrido el tiempo de incubación con los compuestos se agregó MTT al 5% a cada pocillo y se procedió a incubar durante 4 horas protegiendo las placas de la luz. Una vez transcurridas las 4 horas de la reacción, se eliminó el medio y se realizaron dos lavados con PBS, se añadió la solución de parada y se siguieron los pasos del protocolo mencionados previamente en el punto 3.6.

### **3.8 Establecimiento de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) de las bases de Schiff**

Tras valorar los resultados y elegir los compuestos que presentaron una mejor actividad leishmanicida se procedió a preparar diluciones de los mismos para realizar una curva de concentración y determinar la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>), es decir, la concentración a la que los parásitos mueren en un 50%, en *Leishmania mexicana* y la concentración citotóxica media (CC<sub>50</sub>), es decir la concentración a la que los macrófagos mueren en un 50%, en macrófagos murinos inmortalizados (ver tabla 4). Para esta metodología se sigue el protocolo

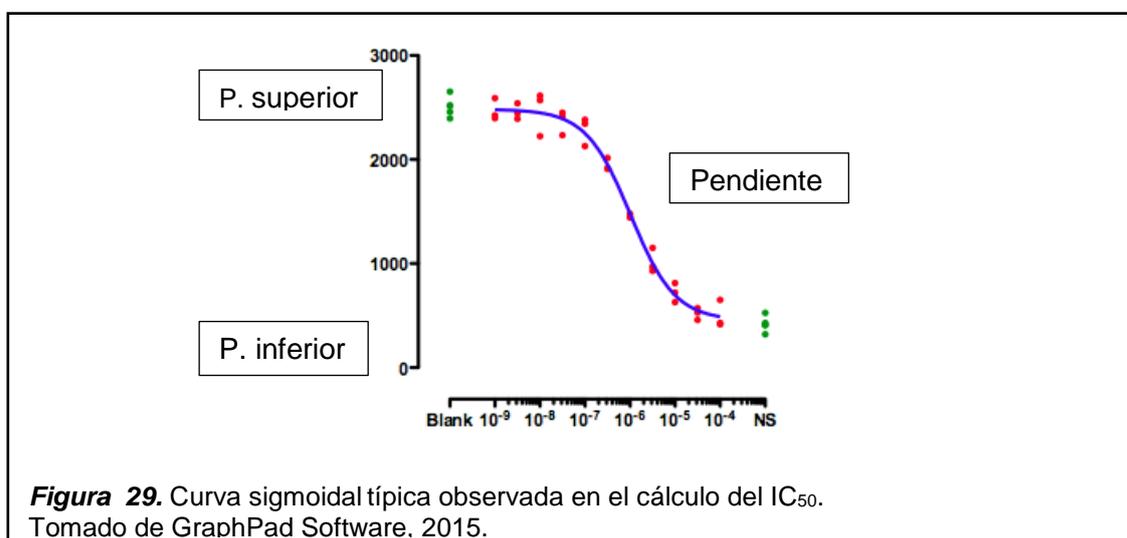
descrito en el punto 3.6 para determinar el IC<sub>50</sub> y en el punto 3.7 para determinar el CC<sub>50</sub> con una modificación: se agregaron solamente los compuestos escogidos **LD8** y **LD12** a diferentes diluciones.

Para determinar el IC<sub>50</sub> se utilizó el software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc versión 6.07). Este programa utiliza la siguiente fórmula:

$$Y = \frac{\text{Parte inferior} + (\text{parte superior} - \text{parte inferior})}{1 + 10^{(\text{LogIC50} - X) \times \text{pendiente}}} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

GraphPad Software, 2015.

El mismo programa transforma todos los datos que se obtienen en el eje de las X para su posterior análisis (Graziose *et al.*, 2012, p. 457). En la figura 29 se puede observar una curva típica que se obtiene con el programa, en donde se distinguen los diferentes elementos que se toman en consideración para realizar los cálculos empleando la ecuación 1. En el eje de las X se encuentran los datos de los diferentes experimentos, transformados a Logaritmo, mientras que en el eje de la Y se encuentran las diferentes concentraciones utilizadas.



### 3.9 Determinación del tiempo-respuesta

Se realizó una prueba para determinar el tiempo/ respuesta de ambos compuestos, con este objetivo, se probaron los compuestos a la concentración del IC<sub>50</sub> a 48 horas, 24 horas y 12 horas, realizando para cada intervalo de tiempo el procedimiento previamente descrito en el punto 3.6.

### 3.10 Daño del potencial de membrana por citometría de flujo

Los parásitos se colectaron del medio de cultivo en su fase logarítmica (4 días luego del pase), se contaron en una cámara de Neubauer y se ajustó la densidad de los mismos a  $1.0 \times 10^7$  parásitos/ mL en medio SDM. Se sembraron 100  $\mu$ L de la suspensión de los parásitos en micro placas de 96 pocillos de fondo cónico (Nunc™, Thermofisher Scientific, EE.UU, 249935), se agregó 1  $\mu$ L de ambos compuestos a las siguientes concentraciones: para **LD8** 125,0  $\mu$ L, 77,3  $\mu$ L y 51,4  $\mu$ L y para **LD12** 100,0  $\mu$ L, 60,0  $\mu$ L y 25,0  $\mu$ L, tomando en cuenta la curva que se obtuvo del software GraphPad Prism. Algunos pocillos se destinaron a los controles del experimento (Brenzan *et al.*, 2007, p. 717). Como controles negativos se cultivaron los parásitos sin tratamiento en presencia del fluoróforo bis-(ácido 1,3-dibutilbarbiturico) trimetino oxonol (DiBAC<sub>4</sub>(3)) (Sigma-Aldrich, EE.UU, D8184), los parásitos sin tratamiento y sin el fluoróforo DiBAC<sub>4</sub>(3) y los parásitos tratados con DMSO al 1% con el fluoróforo; como controles positivos los parásitos tratados con pentamidina y los parásitos tratados con digitonina a una concentración por pocillo de 25  $\mu$ M (Sigma-Aldrich, EE.UU, D141), compuesto que ocasiona un daño en el potencial de membrana de las células (Remão *et al.*, 2014, p. 3), ambos en presencia del fluoróforo. Las placas se dejaron incubar por 30 minutos, 1 hora, 3 horas y 6 horas respectivamente a 24°C (Brenzan *et al.*, 2007, p. 717).

Se analizó el cambio del potencial de membrana que ocurre en el parásito en estado promastigote procíclico tras la aplicación de los tratamientos respectivos,

en los diferentes intervalos de tiempo previamente descritos. Para cumplimentar este objetivo, se agregaron 10 $\mu$ L del fluoróforo a una concentración de 5 ng/mL en cada pocillo y se dejó incubar por 10 minutos a 24°C. El ensayo se realizó mediante el uso del citómetro de flujo (BD accuri™ C6 Flow Cytometer) utilizando el filtro óptico FL1 que detecta la emisión entre 533/30 nm y se midieron 1x10<sup>4</sup> eventos por cada ensayo. Los datos obtenidos de las lecturas de las muestras fueron analizados en el software BD CSampler™ Analysis Software de BD Biosciences versión 1.0.264.21 (Plock, Sokolowska-Köeler y Presber, 2001, p. 145).

### **3.11 Análisis de la carga parasitaria y viabilidad celular por qRT-PCR**

Tras la infección de los macrófagos como se describe en el punto 3.4 y transcurridas 2 horas post infección, se realizaron dos lavados con PBS para remover los parásitos que no infectaron las células. Posteriormente se agregaron 30  $\mu$ L del compuesto **LD8** a la concentración obtenida del IC<sub>50</sub>, varios pocillos fueron destinados a los controles. La placa se incubó por 24 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 18% de O<sub>2</sub>. Como controles negativos del experimento se emplearon los macrófagos sin tratamiento, los parásitos sin tratamiento, los macrófagos infectados sin tratamiento y los macrófagos tratados con DMSO al 1%; como control positivo se empleó los macrófagos infectados tratados con pentamidina a la concentración antes mencionada.

Transcurridas las 24 horas de incubación se removió el medio y se realizó la extracción del RNA total, para lo cual se siguieron las instrucciones del fabricante del kit PureLink® RNA Mini Kit (Thermofisher Scientific, EE.UU, 12183025). El DNA residual se removió por digestión con DNAsas utilizando el PureLink® DNase Set (Thermofisher Scientific, EE.UU, 12185010) siguiendo las indicaciones del fabricante, y el RNA total extraído se cuantificó con la ayuda del lector de microplacas multi detección (van den Bogaart, Schoone, Adams y Schalling, 2014, p. 15).

En la PCR cuantitativa (qRT-PCR), método por el cual se obtiene de manera rápida la medición de la cantidad del producto de PCR (Rahman, Uddin, Moue y Setu, 2013, pp. 1-3), se empleó como gen de expresión constitutiva la  $\beta$ -2M (beta-2 microglobulina) humana, mientras más cantidad existe de este material mayor cantidad de macrófagos viables se encuentran en el experimento, y para el análisis de la carga parasitaria, la secuencia que codifica para la subunidad 18S del RNA ribosomal que se encuentra conservada en los parásitos del género *Leishmania* spp y que indica que mientras más cantidad se obtenga más cantidad de parásitos vivos se encuentra en el ensayo (van den Bogaart *et al*, 2014, pp. 15-16, 17-19). Como lo especifica van den Bogaart y sus colaboradores (2014, pp. 15-16) la subunidad del RNA ribosomal 18S se amplificó con los primers: sentido 5' -CCAAAGTGTGGAGATCGAAG-3', antisentido 5'-GGCCGGTAAAGGCCGAATAG-3'; y se usó la sonda 5'-6FAM-ACCATTGTAGTCCCACTGC-3'-NFQ. Para amplificar la  $\beta$ -2M se utilizaron los primers: sentido 5'-GGCTATCCAGCGTACTCCAA-3', anti sentido 5'-GATGAAACCCAGACACATAGCA-3' y se empleó la sonda 5'-6VIC-GATGAAACCCAGACACATAGCA-3'-NFQ'. Los primers y sondas fueron proporcionados por Thermofisher Scientific, EE.UU (van den Bogaart *et al*, 2014, pp. 15-16).

Para la reacción de PCR se siguieron las especificaciones del inserto de TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step Kit (Applied Biosystems®, Thermofisher Scientific, EE.UU, 4392938). Para llevar a cabo la reacción de qRT-PCR en el caso de las células se agregaron 20 ng/  $\mu$ L de cada muestra de RNA, 5 $\mu$ L de la mezcla TaqMan® RT-PCR (2X), 1  $\mu$ L de la sonda y de los primers (1X), 0,25 $\mu$ L de la enzima TaqMan® RT y se complementó con agua DEPC a un volumen final de 10 $\mu$ L. Para la reacción, en el caso de los parásitos, se agregaron 3 $\mu$ L de cada muestra de RNA (a la máxima concentración obtenida), 5 $\mu$ L de la mezcla TaqMan® RT-PCR (2X), 0,32  $\mu$ L de los primers, 0,2  $\mu$ L de la sonda, 0,25 $\mu$ L de la enzima TaqMan® RT y se complementó con agua DEPC a un volumen final de 10 $\mu$ L. La PCR se llevó a cabo en el termociclador en las siguientes condiciones: 10 minutos a 50°C, 5 minutos a 95°C seguido por 45 ciclos, cada

uno de 30 segundos a 95°C y 45 segundos a 60°C (van den Bogaart *et al.*, 2014, pp. 15-16).

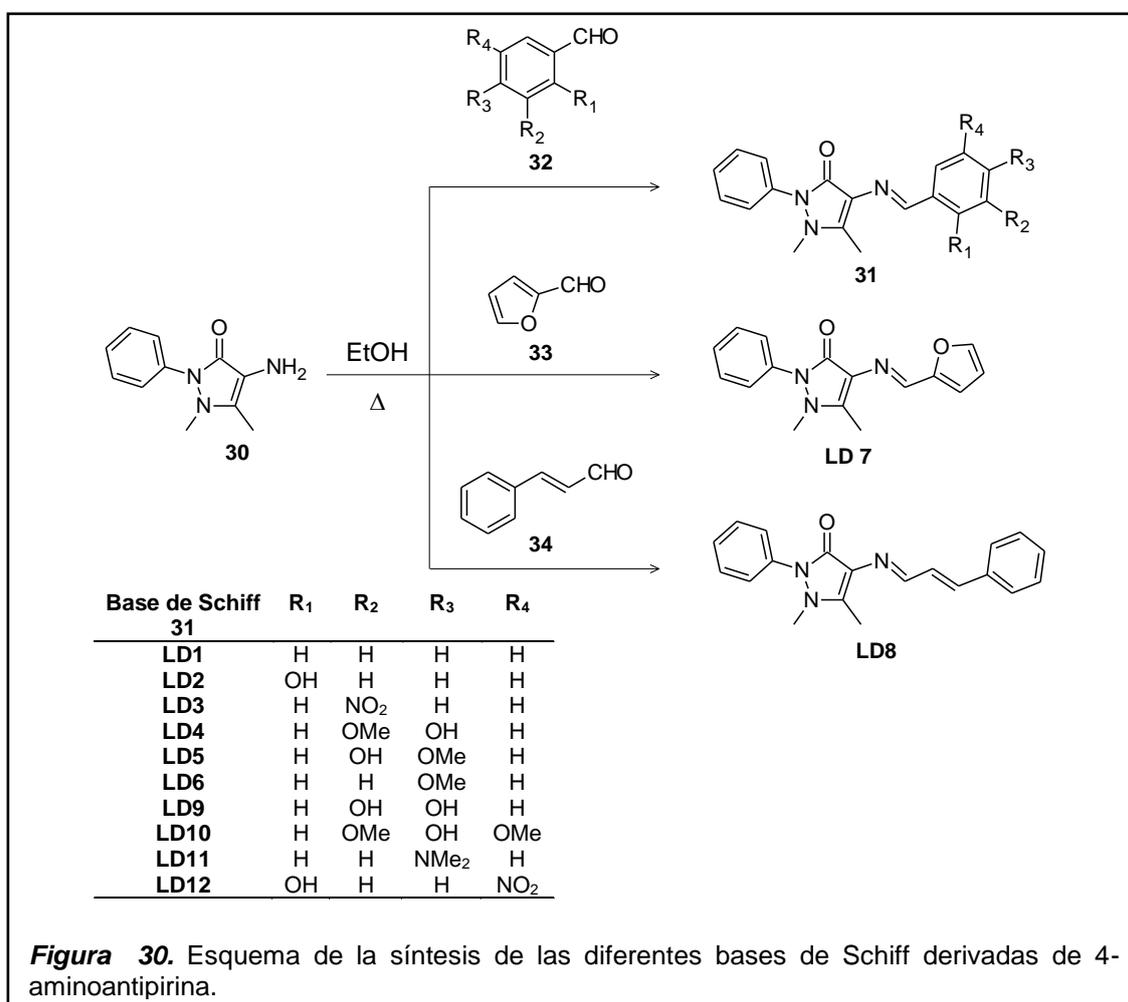
### **3.12 Análisis estadístico**

El diseño experimental empleado fue completamente al azar (DCA), lo que implica que todos los tratamientos presentaron un arreglo aleatorio. Se realizaron al menos tres experimentos independientes para cada análisis y cada tratamiento por triplicado. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el software SPSS de IBM Corporation versión 23.0. La diferencia en la significancia estadística se calculó con la prueba ANOVA y se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% para establecer las diferencias significativas entre las medias de los controles y los tratamientos. Las diferencias entre dos parámetros se consideraron estadísticamente significativas a un valor de P (significación asintótica) menor que 0,05.

## 4 CAPÍTULO IV. Resultados y Discusión

### 4.1 Síntesis de las bases de Schiff de 4-aminoantipirina

La síntesis de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina se realizó mediante la condensación entre **30** y los diferentes aldehídos **32-34**, tal como se observa en la figura 30. En la tabla descrita en la misma figura, se describen las diferentes combinaciones de sustituyentes que fueron utilizados para todos los compuestos.



**Figura 30.** Esquema de la síntesis de las diferentes bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina.

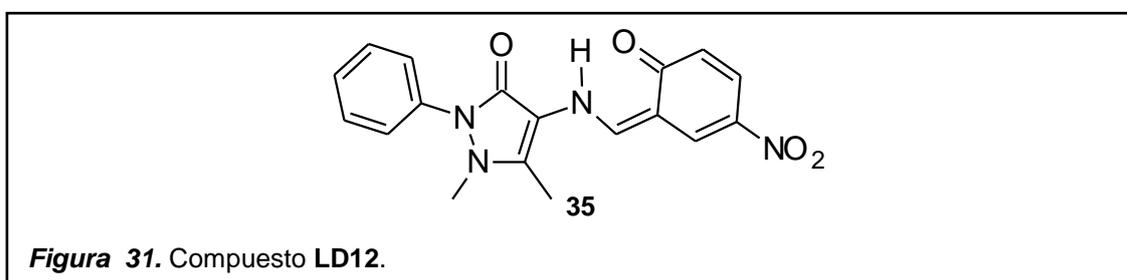
#### 4.2 Análisis de la actividad antiparasitaria y leishmanicida de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina.

Con el fin de comparar el efecto de estos compuestos frente a diferentes parásitos se decidió realizar, en las primeras etapas del estudio, ensayos con *Leptomonas* y *Leishmania*. Para evaluar el efecto antiparasitario de las doce bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina, se les administró a ambos parásitos, la concentración más alta de los compuestos, especificada en la tabla 4, y se dejaron incubar por espacio de 48 horas. Transcurrido este intervalo de tiempo se realizó el ensayo de MTT. Los datos obtenidos fueron expresados en porcentaje de viabilidad, se calculó el promedio de los porcentajes de los diferentes ensayos y se procedió a su análisis. El efecto que ocasionó cada uno de los compuestos fue comparado con el un compuesto de actividad leishmanicida conocida. En el caso de *Leptomonas* se utilizó la anfotericina y para *Leishmania* la pentamidina.

En la figura 32 se puede observar que los compuestos con mejores resultados frente a las *Leptomonas* fueron **LD8** y **LD12**. El compuesto **LD8** a una concentración de 787,7  $\mu\text{M}$  generó un porcentaje de viabilidad de  $26,7\% \pm 6,2\%$ , mientras que el compuesto **LD12** a una concentración de 709,5  $\mu\text{M}$  generó un porcentaje de viabilidad de  $33,2\% \pm 10,6\%$ . **LD3**, **LD5-LD7** y **LD10** no presentaron actividad mientras que **LD1**, **LD2**, **LD4**, **LD9** y **LD11** generaron porcentajes de viabilidad entre el 70%-90%.

Una práctica común para el análisis de las actividades de nuevos compuestos consiste en realizar un análisis de estructura-actividad (SAR) para lo cual se sintetizan compuestos que incorporan diferentes grupos funcionales en diferentes partes de su estructura y se analiza su respuesta (Bello *et al.*, 2001, p. 5047). Si se analiza la estructura de las bases de Schiff se puede observar que **LD8** presenta una extensión en la conjugación de la imina y el anillo aromático no presenta ningún sustituyente, mientras que en **LD12** se observa un hidroxilo (grupo electro dador) en posición *orto* y un nitro (grupo electro aceptor) en posición *meta* (respecto al OH). Es bastante evidente el efecto sinérgico que

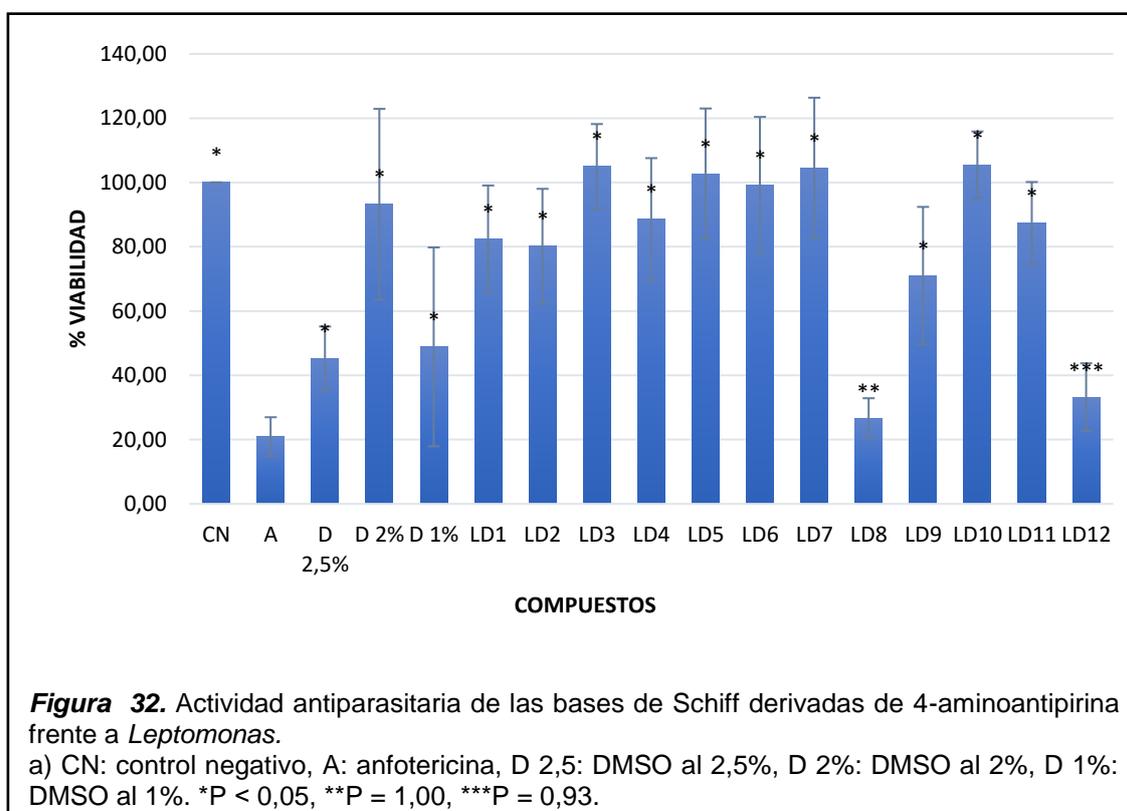
ejercen los dos sustituyentes en el anillo en el compuesto **LD12** ya que cuando estos están separados, hidroxilo en **LD2** y nitro en **LD3**, la actividad es baja en el primer caso y nula en el segundo. El hidroxilo en posición *orto* puede formar un puente de hidrógeno intramolecular con el nitrógeno de la imina (Issa, Khedr y Rizk, 2005, p. 624), el cual, debido a los efectos inductivos, de campo y resonante del grupo nitro, favorecería el tautomerismo ceto-enólico para generar el tautómero ceto **35** (Fig. 31), el cual podría ser en parte, el responsable de la actividad observada.



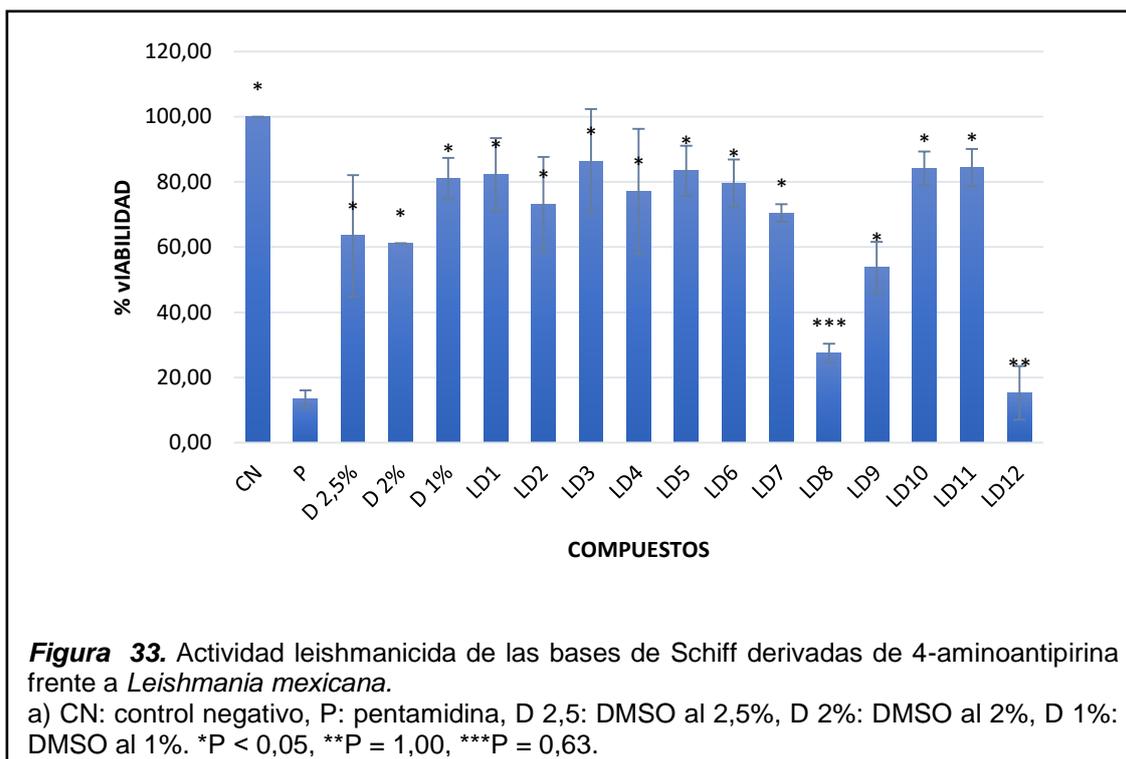
En la figura 32 también se puede observar el efecto del DMSO, que es el reactivo empleado como solvente de los compuestos, y se estableció, que la mejor concentración de DMSO para utilizar frente a estos parásitos es el 2% ya que generó un porcentaje de viabilidad del  $93,2\% \pm 29,7\%$ .

Cuando se realizó el experimento del efecto sobre *Leishmania mexicana* (Fig. 33) se pudo apreciar el mismo comportamiento de los compuestos que el observado en *Leptomonas* siendo los compuestos más activos **LD8** y **LD12**. Concretamente, frente a este parásito, **LD8** (a una concentración de  $393,8 \mu\text{M}$ ) arrojó un porcentaje de viabilidad de  $27,5\% \pm 2,9\%$ , mientras que **LD12** (a una concentración de  $354,8 \mu\text{M}$ ) mostró un valor de  $15,3\% \pm 8,3\%$ . Los compuestos **LD1**, **LD3**, **LD5**, **LD6**, **LD10** y **LD11** no presentaron actividad, mientras que **LD2**, **LD4** y **LD7** mostraron muy baja actividad ya que los porcentajes de viabilidad observados oscilan entre el 70-80%. Solamente **LD9** a una concentración de  $386,6 \mu\text{M}$  mostró un porcentaje de viabilidad de 53,7%. Al analizar la estructura

de los compuestos activos, se aprecia el mismo efecto en **LD12** que el observado en el caso de *Leptomonas*.



Al analizar el efecto del solvente se pudo evidenciar que el parásito *Leishmania* es más sensible al DMSO que *Leptomonas*. En este caso la mejor opción fue usar el DMSO al 1%. Con esta concentración se obtuvo un porcentaje de viabilidad del 81,2% ± 6,2%. Este efecto es importante, especialmente cuando se están estableciendo nuevos protocolos ya que al realizar este tipo de ensayos con el solvente previo a los ensayos con los compuestos, permite determinar la concentración óptima y asegurar que los resultados sean fiables y no dependan del solvente usado.



La concentración del solvente utilizado en esta investigación (DMSO) es elevado en comparación con lo reportado en otros estudios, esto se debe a que la solubilidad de las bases de Schiff estudiadas en este Trabajo de Titulación es baja, por lo que se realizaron ensayos con diferentes concentraciones del solvente con el fin de establecer el porcentaje que ejerciera un menor efecto sobre los parásitos y que a su vez proporcionara concentraciones altas del compuesto para el tratamiento. González y sus colaboradores (2005, p. 138) utilizan DMSO al 0,1% y especifican que el solvente no presenta ningún tipo de interferencia. Otros autores reportan el uso de concentraciones más altas, así Van de Ven, *et al.* (2012, p. 145) reportan una concentración final del 0,6%, y Keurulainen, *et al.*, (2015, p. 1677) utilizan DMSO al 1% tanto en parásitos como en células, que coincide con el porcentaje empleado en estos experimentos.

Los resultados de actividad de los compuestos se analizaron estadísticamente, para lo cual se realizó un ANOVA con un nivel de confianza al 95%. La hipótesis nula (H0) y la hipótesis alternativa (H1) que se plantearon fueron las siguientes:

H0: Las medias son iguales.

H1: Las medias son diferentes.

De acuerdo con los resultados presentados en la tabla 5 se pudo concluir que existe una diferencia significativa entre los tratamientos para ambos parásitos. El valor F se confrontó con el valor crítico (VC) y se puede apreciar que los valores de F son mayores que el VC, por lo cual se acepta la hipótesis alternativa, que establece que todos los tratamientos presentan una diferencia significativa entre ellos. Resultado que se corrobora con un valor P menor a 0,05.

**Tabla 5.** Análisis estadístico de la actividad de **LD1-LD12** mediante ANOVA.

	<i>Leptomonas</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
<b>F</b>	44,3	72,0
<b>Valor crítico</b>	1,72	1,73
<b>P</b>	<0,0001	<0,0001

Nota: F: estadístico de prueba, P: significación estadística.  $P > 0,05$  es el valor que se establece en primera instancia con el fin de confrontar el valor obtenido de la prueba con el ya establecido (P establecido también se lo denomina como valor  $\alpha$ ). El valor obtenido de P deber ser mayor a 0,05 para que se acepte la hipótesis nula.

Teniendo en cuenta este resultado, se procedió a realizar la prueba de comparación múltiple de medias de acuerdo con el criterio de Tukey para comparar los tratamientos por pares con respecto al control positivo en cada caso. Esta prueba se realizó con la finalidad de determinar aquellos compuestos que producían un efecto similar al control positivo. Por lo tanto, los compuestos que generan un efecto similar a la anfotericina o a la pentamidina, se consideran de interés. Para este análisis se tomaron en cuenta las mismas hipótesis que en el caso anterior. La variable de respuesta evaluada fue el porcentaje de viabilidad que generaban los compuestos tras el tratamiento. En la tabla 6 se presentan los resultados del análisis estadístico en donde se analizan las diferencias de medias y el valor P de la actividad de los compuestos **LD1-LD12** en *Leptomonas* y *Leishmania mexicana*. Como ya se concluyó anteriormente, frente a ambos parásitos, los compuestos **LD8** y **LD12** presentan una actividad similar a la de

los controles positivos. Este efecto se confirma con el valor P, cuyos valores para ambos compuestos son mayores a 0,05; aceptando la hipótesis nula.

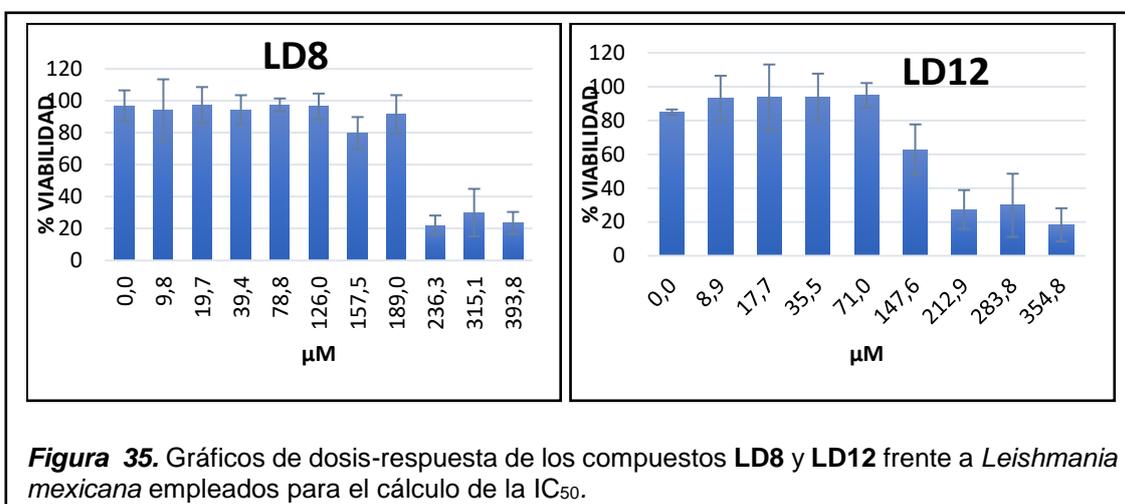
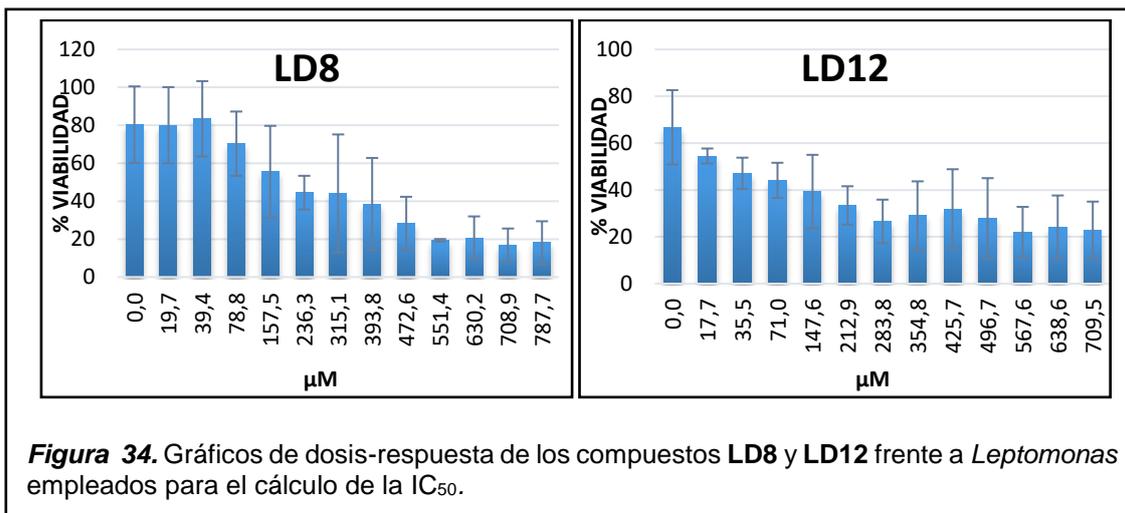
**Tabla 6.** Análisis estadístico de la actividad de los compuestos LD1-LD12 en *Leptomonas* y *Leishmania mexicana* mediante la prueba de Tukey.

Tratamientos	<i>Leptomonas</i> <sup>a</sup>		<i>Leishmania mexicana</i> <sup>b</sup>	
	Diferencia de medias	P	Diferencia de medias	P
Control N	-79,1*	0	-83,8*	0
DMSO	-79,6*	0	-82,6*	0
LD1	-62,0*	0	-66,6*	0
LD2	-59,7*	0	-57,4*	0
LD3	-91,5*	0	-70,7*	0
LD4	-67,1*	0	-59,7*	0
LD5	-81,3*	0	-66,8*	0
LD6	-77,1*	0	-62,4*	0
LD7	-82,3*	0	-56,5*	0
LD8	-6,4	1,00	-11,2	0,63
LD9	-63,0*	0	-37,6*	0
LD10	-77,3*	0	-85,5*	0
LD11	-64,7*	0	-83,6*	0
LD12	-10,8	0,93	0,91	1,00

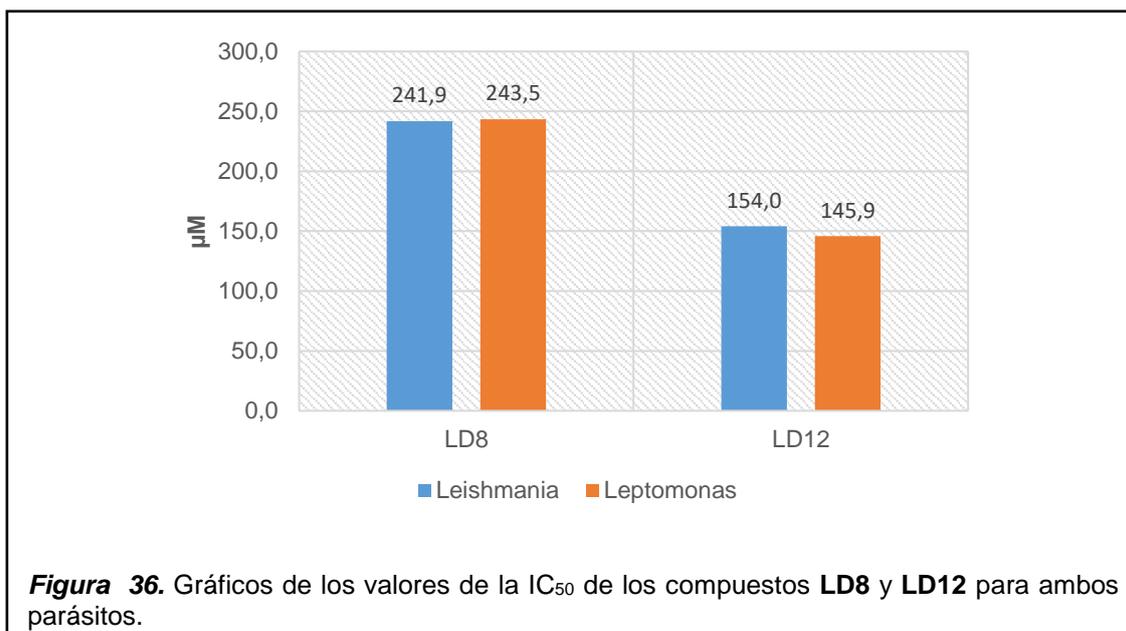
Nota: el símbolo \* que se visualiza en el lado derecho de algunos resultados obtenidos, representa desigualdad con respecto al control positivo. (a) Se usó anfotericina como control positivo, (b) se usó pentamidina como control positivo. El valor obtenido de P debe ser mayor a 0,05 para que se acepte la hipótesis nula.

#### 4.2.1 Concentración Inhibitoria media de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina frente a *Leptomonas* y *Leishmania mexicana*.

Tras seleccionar los candidatos que presentaron la mejor actividad frente a los parásitos se realizó el análisis de la concentración inhibitoria media o IC<sub>50</sub>. Con este objetivo se administraron diferentes concentraciones de los dos compuestos activos al cultivo de cada parásito (para **LD8** se utilizaron concentraciones que oscilan entre 0,0 - 787,7 µM y para **LD12** se utilizaron concentraciones que oscilan entre 0,0 - 709,5 µM) y se les dejó incubar por espacio de 48 horas. Los resultados obtenidos para *Leptomonas* se muestran en la figura 34, y para *Leishmania mexicana* en la figura 35.



Estos datos se ingresaron en el programa GraphPad Prism en el cual se calcularon los valores de la IC<sub>50</sub> de los compuestos para cada uno de los parásitos, como se muestra en la figura 36.



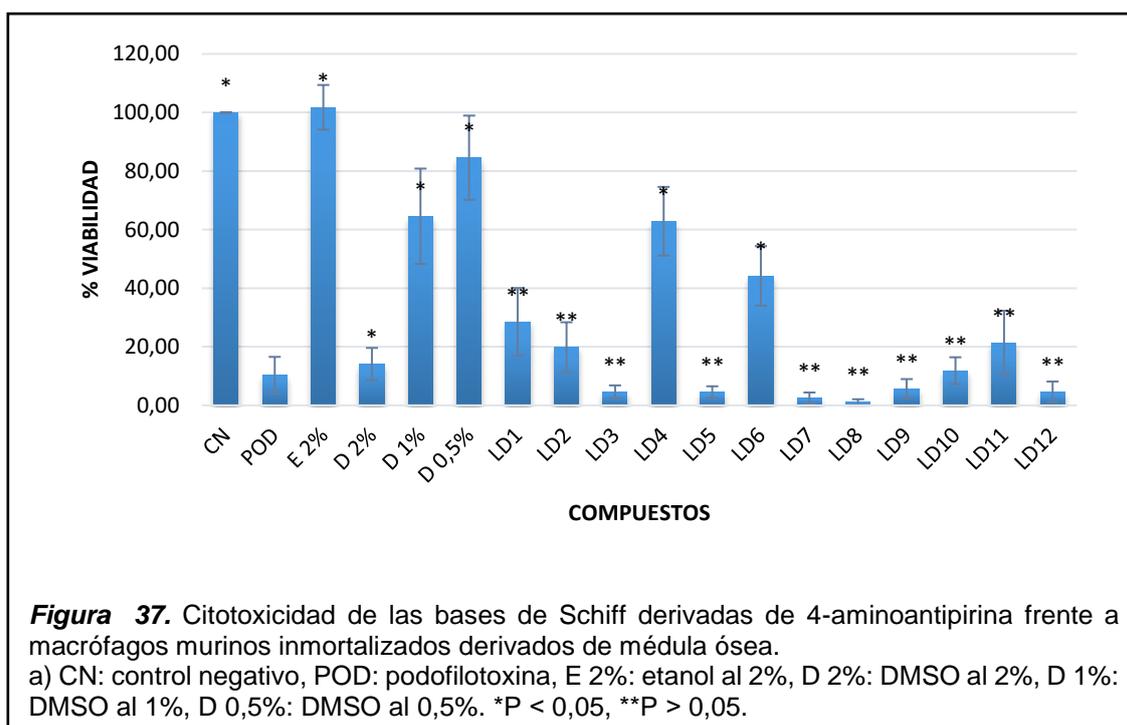
#### 4.3 Evaluación citotóxica de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina frente a macrófagos murinos inmortalizados derivados de médula ósea.

El propósito de estos experimentos fue conocer la toxicidad que generan los compuestos en los macrófagos murinos inmortalizados derivados de médula ósea. Como se puede apreciar en la figura 37, todos los compuestos probados en este Trabajo de Titulación resultaron altamente tóxicos. El tratamiento con el compuesto **LD8** condujo a porcentaje de viabilidad del  $1,1\% \pm 0,99\%$  y el tratamiento con el compuesto **LD12** arrojó un porcentaje de viabilidad del  $4,6\% \pm 3,5\%$ . En estos experimentos se trató a las células con los compuestos a la concentración especificada en la tabla 3 y se dejaron incubando por espacio de 48 horas.

Al realizar el análisis del efecto del solvente sobre macrófagos, se pudo observar que la concentración del 2% resultó muy tóxica, mientras que el porcentaje de viabilidad observado a una concentración del 1% fue del  $64,6\% \pm 16,3\%$ . Los únicos compuestos que presentan una toxicidad media fueron el **LD4** y el **LD6**,

sin embargo estos no mostraron actividad frente a los parásitos, por lo que careen de relevancia para esta investigación.

Al analizar el efecto del solvente (ver figura 37) se aprecia el mismo efecto que el observado en el caso de los parásitos. El DMSO resultó ser bastante tóxico para los macrófagos, debido a la alta concentración que se tuvo que emplear para solubilizar los compuestos, y la necesidad de probar las mismas concentraciones que en el caso de los parásitos para poder comparar su efecto. En investigaciones previas Cavalcanti *et al.* (2014, p. 590) emplean una concentración del 0,1%, mientras que en estudios realizados en monocitos se ha reportado el uso de DMSO al 0,5% (Jaguin, Fardel y Lecreur, 2015, p. 173) aunque también se ha llegado a utilizar una concentración del 1% en células (Keurulainen *et al.*, 2015, p. 1677).



Tras obtener los resultados antes mencionados se procedió a realizar el análisis estadístico de los datos de citotoxicidad frente a los macrófagos murinos inmortalizados derivados de la médula ósea, para lo cual se utilizó un ANOVA

con un nivel de confianza del 95%. La hipótesis nula (H0) y la hipótesis alternativa (H1) que se plantearon fueron:

H0: Las medias son iguales.

H1: Las medias son diferentes.

En la tabla 7 se resumen los resultados obtenidos tras el análisis estadístico, en los cuales se evidencia que existe una diferencia significativa en la viabilidad de los macrófagos expuestos a los compuestos (**LD1-LD12**). El estadístico de prueba se confrontó con el valor crítico y se pudo deducir que la hipótesis alternativa se ajusta a los datos ( $F > VC$ ). Esto implica que todos los tratamientos presentan una diferencia significativa al ser comparados entre ellos. El valor P menor que 0,05, corrobora el resultado antes mencionado.

**Tabla 7.** Análisis estadístico de la citotoxicidad de **LD1-LD12** frente a macrófagos mediante ANOVA.

	<b>Macrófagos</b>
<b>F</b>	114,2
<b>Valor crítico</b>	1,70
<b>P</b>	<0,0001

Nota: El valor obtenido de P deber ser mayor a 0,05 para que se acepte la hipótesis nula.

Teniendo en cuenta este resultado, se procedió a realizar la prueba de comparación múltiple de medias de acuerdo con el criterio de Tukey con el objetivo de comparar los tratamientos por pares con respecto al control positivo (podofilotoxina). La finalidad de esta prueba fue determinar los compuestos que generaban una respuesta similar al control o sea, que fueran tóxicos para las células. En esta prueba se tuvieron en cuenta las mismas hipótesis planteadas anteriormente. La variable de respuesta medida fue el porcentaje de viabilidad que generaba el tratamiento con los diferentes compuestos. Los resultados de este análisis se presentan en la tabla 8, en la cual se pueden apreciar las diferencias de las medias y el valor P. Como se puede observar, estadísticamente los compuestos **LD4** y **LD6** no son compuestos tóxicos para

las células, sin embargo, se deben realizar otro tipo de experimentos para comprobar esta conclusión; mientras que el resto de los compuestos tienen un efecto similar al control positivo. Este resultado se corroboró con el valor P, ya que para los compuestos **LD4** y **LD6** es menor que 0,05.

**Tabla 8.** Análisis estadístico de la actividad citotóxica de los compuestos **LD1-LD12** en macrófagos mediante la prueba de Tukey.

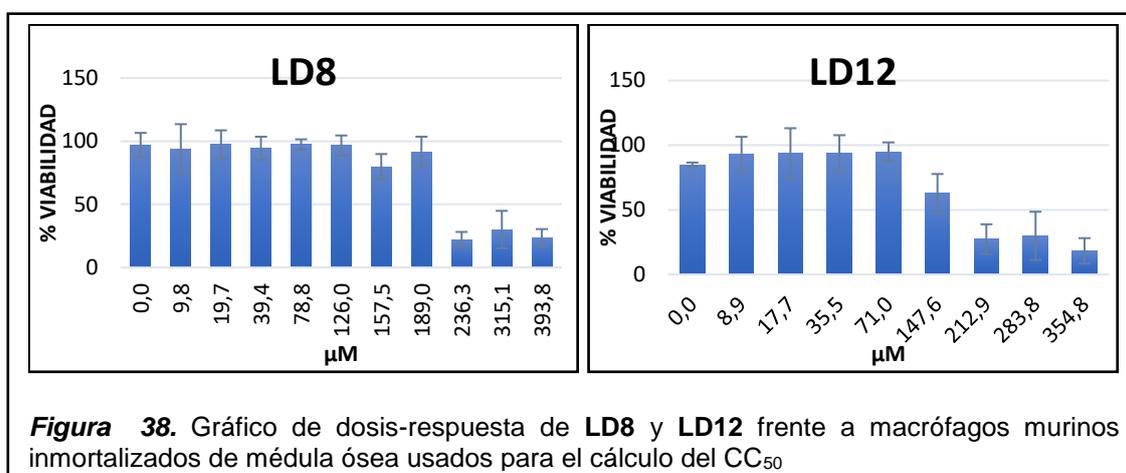
<b>Macrófagos murinos inmortalizados derivados de médula ósea<sup>a</sup></b>		
<b>Tratamientos</b>	<b>Diferencia de medias</b>	<b>P</b>
Control N	-85,7*	0
Etanol	-87,7*	0
DMSO	-37,9*	0
LD1	-11,5	0,402
LD2	-4,1	1,000
LD3	10,4	0,615
LD4	-36,9*	0
LD5	9,2	0,760
LD6	-18,0*	0,006
LD7	12,0	0,343
LD8	13,2	0,299
LD9	6,3	0,986
LD10	5,4	0,998
LD11	-1,4	1,000
LD12	10,2	0,633
P > 0,05		

Nota: (<sup>a</sup>) El control positivo usado fue podofilotoxina.

#### **4.3.1 Concentración citotóxica media de las bases de Schiff derivadas de 4-aminoantipirina frente a macrófagos murinos inmortalizados derivados de médula ósea.**

A pesar de que se estableció que los compuestos **LD8** y **LD12** son sumamente citotóxicos a la concentración más alta ensayada, se decidió realizar la evaluación de la concentración citotóxica media o  $CC_{50}$ . En la figura 38 se aprecian las concentraciones empleadas para establecer la  $CC_{50}$  de los compuestos **LD8** y **LD12** frente a los macrófagos. Analizando ambos gráficos se puede concluir que mientras la concentración de los compuestos disminuye de

igual manera disminuye su toxicidad frente a los macrófagos. La  $CC_{50}$  de ambos compuestos se puede observar en la tabla 9.



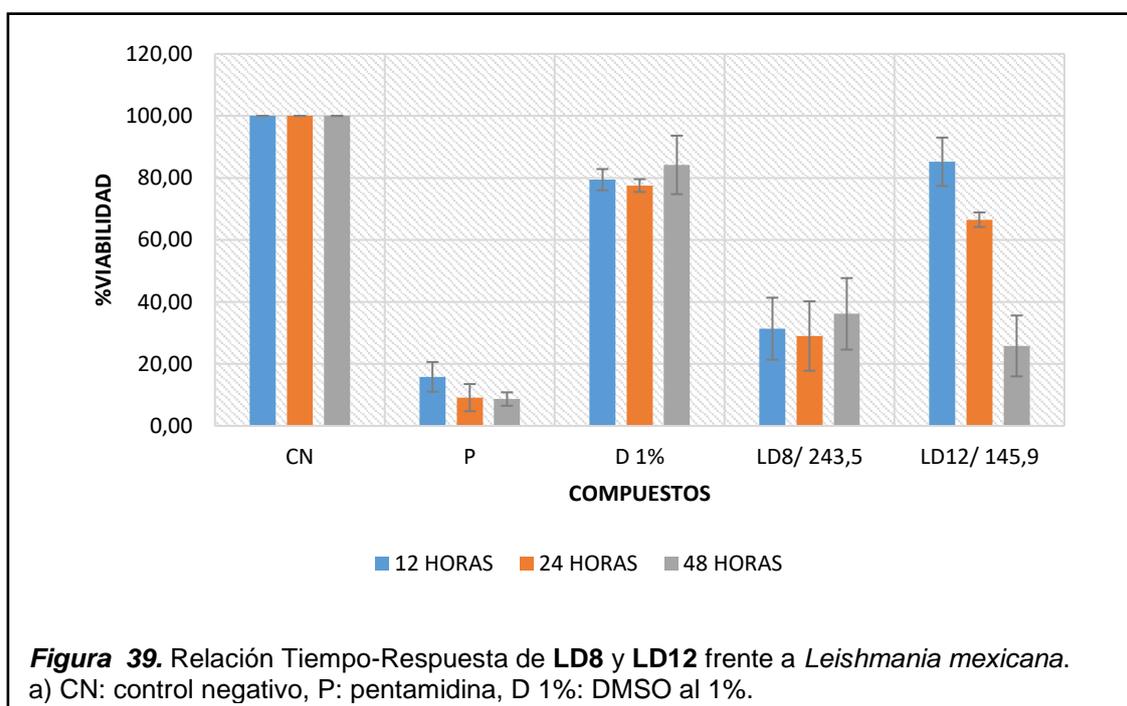
**Tabla 9.** Análisis estadístico obtenido del  $IC_{50}$  y  $CC_{50}$  de los compuestos **LD8** y **LD12** con el programa GraphPad Prism.

Compuesto	Toxicidad en <i>Leptomonas</i>		Toxicidad en <i>Leishmania mexicana</i>		Citotoxicidad en macrófagos	
	$IC_{50}$ [μM]	Intervalo de confianza al 95%	$IC_{50}$ [μM]	Intervalo de confianza al 95%	$CC_{50}$ [μM]	Intervalo de confianza al 95%
<b>LD8</b>	241,9	128,4   455,6	243,5	208,9   283,7	16,5	9,1   30,1
<b>LD12</b>	154,0	80,8   293,5	145,9	128,6   165,6	88,5	70,0   111,9

#### 4.4 Análisis del tiempo respuesta de las concentraciones obtenidas en el $IC_{50}$ .

Para determinar la rapidez de acción de los compuestos activos frente a *Leishmania mexicana*, se realizó una evaluación del tiempo-respuesta de los compuestos **LD8** y **LD12** a las respectivas concentraciones de inhibición media determinadas previamente. Como se puede apreciar en la figura 39 el compuesto **LD8** a las 12 horas muestra un marcado efecto frente al parásito, y este efecto se mantiene hasta las 48 horas post exposición, lo que sugiere que este es un compuesto de acción rápida. Por su parte, el compuesto **LD12** ocasiona una

disminución gradual en el porcentaje de viabilidad hasta reducirlo prácticamente a un tercio a las 48 horas, lo que sugiere que este compuesto es de acción lenta.



Para analizar estadísticamente los resultados se realizó la prueba ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Las hipótesis planteadas son las mismas propuestas en los experimentos previos. En la tabla 10 se evidencia que los resultados del tiempo-respuesta entre los compuestos **LD8** y **LD12** frente a *Leishmania mexicana* son estadísticamente significativos para cada intervalo de tiempo evaluado. El estadístico de prueba se confrontó con el valor crítico y se pudo concluir que la hipótesis alternativa se ajusta a los datos obtenidos. Este resultado se corrobora con el valor P menor que 0,005.

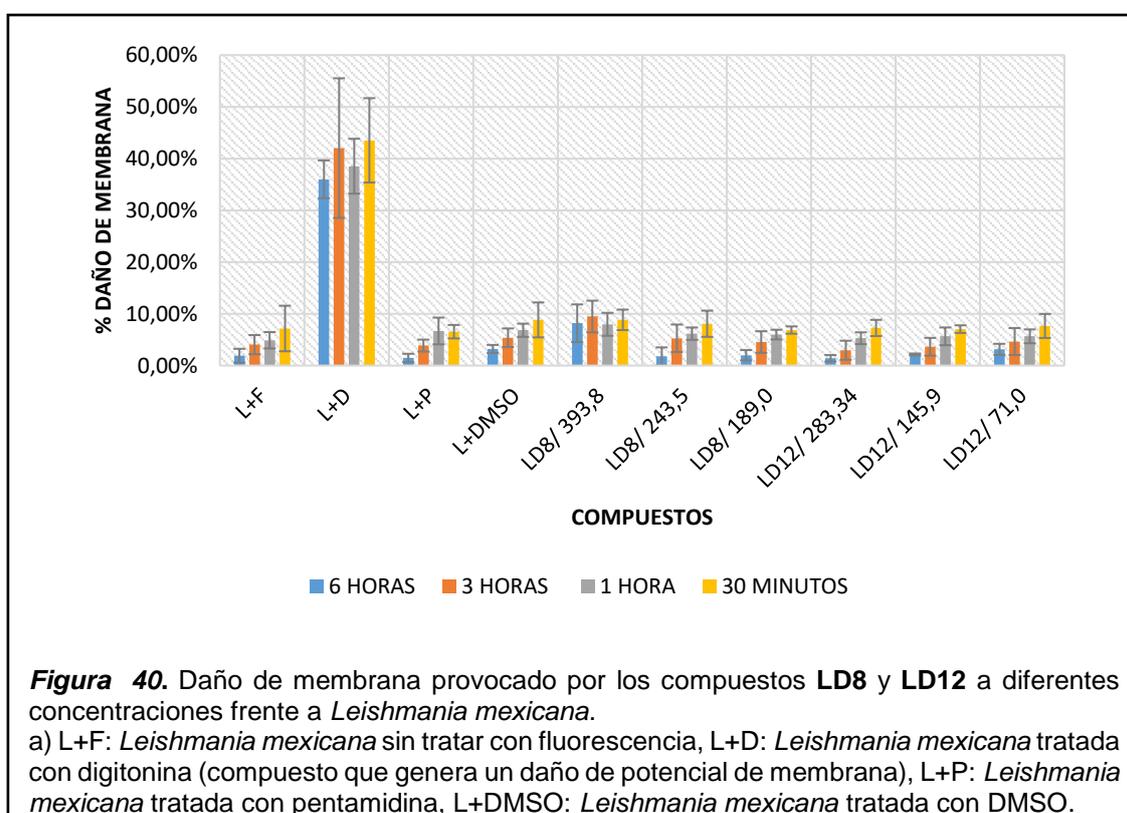
**Tabla 10.** Análisis estadístico del tiempo-respuesta en la actividad leishmanicida de **LD8** y **LD12** frente a *Leishmania mexicana* mediante ANOVA.

	Tiempos		
	12 Horas	24 Horas	48 Horas
<b>F</b>	716,9	364,3	432,7
<b>Valor crítico</b>	2,4	2,4	2,4
<b>P</b>	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Nota: El valor obtenido de P deber ser mayor a 0,05 para que se acepte la hipótesis nula.

#### 4.5 Análisis de la toxicidad que ocasionan los compuestos mediante citometría de flujo.

El propósito de este experimento fue estudiar el efecto de las bases de Schiff de interés frente a la forma promastigote procíclico del parásito. En primera instancia, se evaluó el daño de potencial de membrana que se genera con el tratamiento con los diferentes compuestos, utilizando DiBAC<sub>4</sub>(3) como fluoróforo, el cual ingresa en las células debido a su despolarización y se une a los componentes intracelulares ricos en lípidos (Plock *et al.*, 2001, p. 145). En el gráfico 40 se muestra el porcentaje de daño de membrana ocasionado en *Leishmania mexicana* tras el tratamiento con las concentraciones de los compuestos indicadas en el gráfico, a diferentes intervalos de tiempo. Como se puede constatar, los resultados indican que el mecanismo de acción de estos compuestos no está relacionado con cambios en el potencial de membrana del parásito, que sí se observan en el caso del control positivo, que en este caso es la digitonina.



Para validar estadísticamente los resultados obtenidos por citometría de flujo se realizó una prueba ANOVA con un nivel de confianza de 95%. Las hipótesis planteadas son las mismas especificadas en los experimentos previos. Los resultados obtenidos muestran que existe una diferencia significativa entre todos los tratamientos en cada intervalo de tiempo evaluado. El estadístico de prueba es mayor que el valor crítico, así mismo el valor P es menor que 0,05 lo que corrobora el resultado antes expuesto (ver tabla 11).

**Tabla 11.** Análisis estadístico del daño al potencial de membrana en *Leishmania mexicana* tratado con LD8 y LD12 mediante ANOVA.

	<b>Tiempos</b>			
	<b>0,5 H</b>	<b>1 H</b>	<b>3 H</b>	<b>6 H</b>
<b>F</b>	83,49	162,53	50,29	179,32
<b>Valor crítico</b>	2,02	2,00	2,02	2,09
<b>P</b>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Nota: El valor obtenido de P deber ser mayor a 0,05 para que se acepte la hipótesis nula.

Como se pudo determinar que la hipótesis que se ajustaba a los resultados obtenidos para la prueba ANOVA fue la alternativa, se decidió comparar por pares los resultados con la prueba de Tukey, para poder corroborar que el mecanismo de acción de los compuestos frente a los parásitos no involucraba cambios en el potencial de membrana. Se evaluaron las mismas hipótesis planteadas para los casos anteriores. La variable de respuesta medida fue el porcentaje de daño de membrana. Los resultados obtenidos para esta prueba se resumen en la tabla 12, en donde se observa la diferencia entre medias y el valor P que se contrasta con el valor  $\alpha$  planteado. Estadísticamente ningún compuesto, a ninguna de las concentraciones ensayadas a los diferentes intervalos de tiempo, presenta un efecto similar a la digitonina por lo que se acepta la hipótesis alternativa, y se concluye que este no es el mecanismo de acción de los compuestos frente al parásito. El valor P también corrobora este resultado ya que todos los valores obtenidos son menores que 0,05.

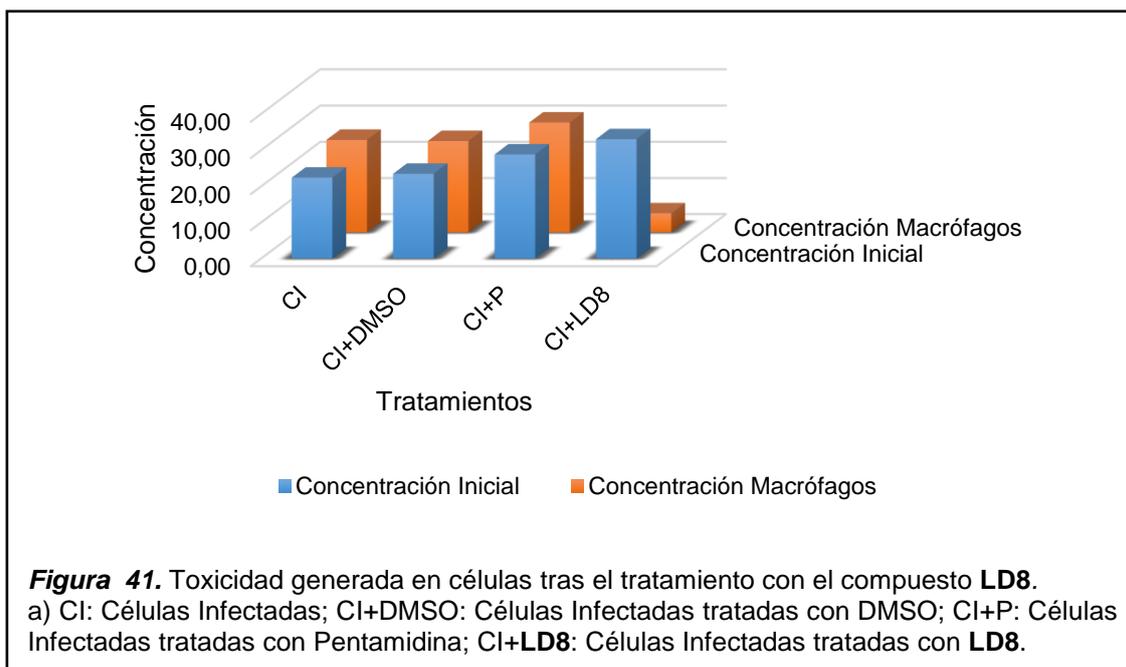
**Tabla 12.** Análisis estadístico del daño al potencial de membrana en *Leishmania mexicana* tratado con **LD8** y **LD12** mediante la prueba de Tukey.

Tratamientos	Tiempo			
	0,5 H	1 H	3 H	6 H
	<b>Diferencia de medias</b>			
<b>CN</b>	0,36*	0,34*	0,38*	0,34*
<b>L+P</b>	0,37*	0,32*	0,38*	0,34*
<b>L+DMSO</b>	0,35*	0,32*	0,37*	0,32*
<b>L+LD8/ 1</b>	0,35*	0,30*	0,32*	0,28*
<b>L+LD8/ 2</b>	0,35*	0,32*	0,37*	0,34*
<b>L+LD8/ 3</b>	0,37*	0,32*	0,37*	0,34*
<b>L+LD12/ 1</b>	0,36*	0,33*	0,39*	0,35*
<b>L+LD12/ 2</b>	0,36*	0,33*	0,38*	0,34*
<b>L+LD12/ 3</b>	0,36*	0,33*	0,37*	0,33*

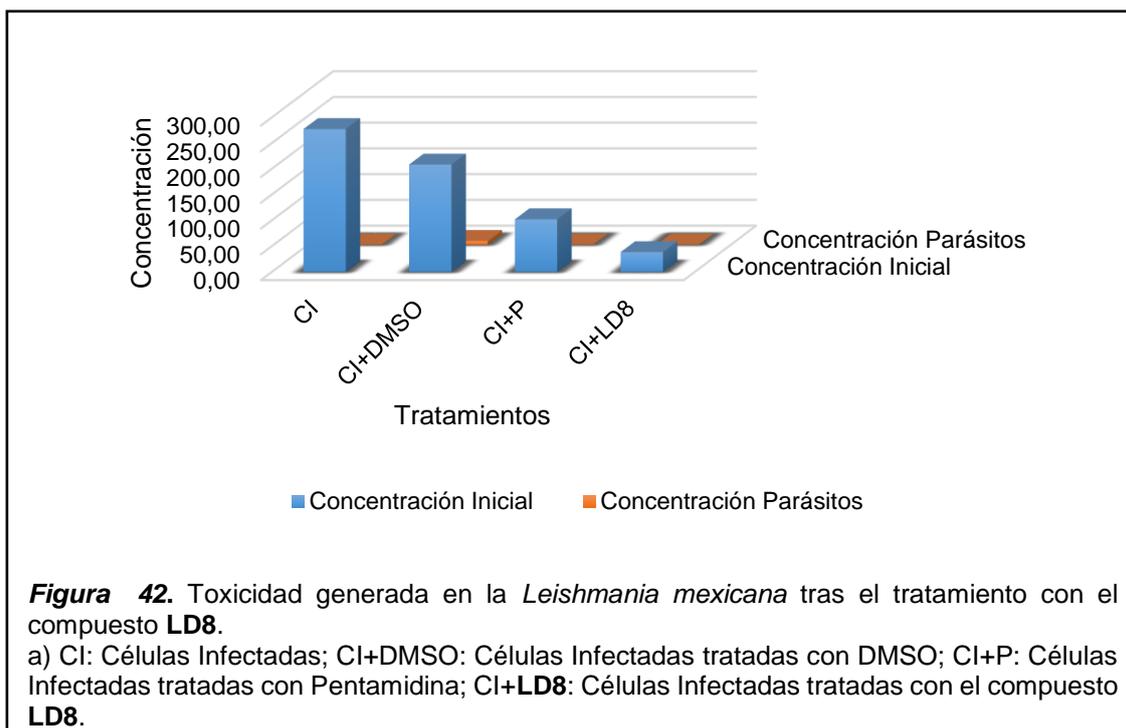
Nota: CN: Control Negativo, L+P: *L. mexicana* tratada con pentamidina, L+DMSO: *L. mexicana* tratada con DMSO, L+LD8/ 1: *L. mexicana* tratada con **LD8** a una concentración de 393,8  $\mu\text{M}$ , L+LD8/ 2: *L. mexicana* tratada con **LD8** a una concentración de 243,5  $\mu\text{M}$ , L+LD8/ 3: *L. mexicana* tratada con **LD8** a una concentración de 189,0  $\mu\text{M}$ , L+LD12/ 1: *L. mexicana* tratada con **LD12** a una concentración de 283,34  $\mu\text{M}$ , L+LD12/ 2: *L. mexicana* tratada con **LD12** a una concentración de 145,9  $\mu\text{M}$ , L+LD12/ 3: *L. mexicana* tratada con **LD12** a una concentración de 71,0  $\mu\text{M}$ . El símbolo \* representa desigualdad con respecto al control positivo. (a) El control positivo usado fue la digitonina. El valor obtenido de P deber ser mayor a 0,05 para que se acepte la hipótesis nula.

#### 4.6 Análisis de la carga parasitaria y la toxicidad celular mediante qRT-PCR

La finalidad de este experimento fue conocer el efecto que tienen los compuestos frente a *Leishmania mexicana* en su forma amastigote intracelular. Para ello se realizaron dos reacciones diferentes de qRT-PCR. La primera tenía como objetivo cuantificar las células viables tras el tratamiento con el compuesto **LD8** a una concentración de 241,9  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) por espacio de 24 horas. Los resultados se pueden apreciar en la figura 41, en donde se encuentra la concentración inicial de RNA total de los macrófagos infectados y la concentración de RNA de los macrófagos tras los tratamientos. La concentración de RNA de los macrófagos tratados con DMSO fue de 25,3 ng/  $\mu\text{L}$  y los tratados con la pentamidina tuvieron una concentración de 30,4 ng/  $\mu\text{L}$ . Sin embargo, la concentración de RNA de los macrófagos tratados con el compuesto **LD8** fue de 5,3 ng/  $\mu\text{L}$ . De este experimento se puede concluir, que el compuesto **LD8** tras 24 horas de incubación es altamente tóxico, mientras que el DMSO y la pentamidina no lo son.



En la segunda qRT-PCR se cuantificó, con las mismas muestras, la cantidad de parásitos presentes tras los tratamientos con DMSO, pentamidina y el compuesto **LD8**. En la figura 42 se observa la concentración inicial de RNA total de macrófagos infectados y la concentración de RNA de parásitos únicamente luego del tratamiento. La concentración de las células infectadas sin ningún tratamiento fue de 0,35 ng/  $\mu$ L mientras que la concentración de las células infectadas tratadas con DMSO, pentamidina y el compuesto **LD8**, fue de 7,30 ng/  $\mu$ L, 0,38 ng/  $\mu$ L y 0,43 ng/  $\mu$ L respectivamente. Con estos datos se pudo concluir que la infección no fue óptima ya que la concentración de parásitos determinada fue muy baja. Por otra parte, tanto la pentamidina como el **LD8** no provocaron ningún efecto en el parásito. Por el contrario, los datos obtenidos en el caso del DMSO apuntan a que este se comportó como un agente que promovió el crecimiento del parásito dentro de los macrófagos. Sin embargo, se necesitan más experimentos que permitan confirmar este comportamiento.



El compuesto **LD12** no pudo ser incluido en este experimento debido a problemas técnicos.

En varios estudios para evaluar el efecto leishmanicida de diversos compuestos se puede evidenciar que los ensayos se realizan con las dos formas del parásito, promastigotes y amastigotes (axénicos e intracelulares) (Marín *et al.*, 2015, p. 171; Behrouzi *et al.*, 2008, p. 4510). No obstante, también existen varios estudios en los que los ensayos se realizan en amastigotes intracelulares infectando macrófagos como es el caso del estudio llevado a cabo por González *et al.* (2005, p. 138). Marín *et al.* (2015, p. 172) especifican que es la manera más adecuada para realizar experimentos para evaluar la efectividad de nuevos tratamientos contra el parásito, debido a que esta la forma en la que se encuentran naturalmente en los macrófagos. Así también concluyen en un trabajo realizado por Vermeersch *et al.* (2009, p. 3856), que tras realizar un estudio del efecto de varios compuestos comerciales frente a promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares concluyeron que el modelo de amastigotes intracelulares es el único enfoque adecuado para determinar los compuestos efectivos contra el parásito. En este Trabajo de Titulación solo se ensayó el

efecto de las bases de Schiff sobre las formas promastigotes procíclicos y amastigotes intracelulares, debido a que tras la transformación de los parásitos en amastigotes axénicos, no fueron viables en las condiciones del laboratorio. Por lo tanto, la hipótesis que se planteó inicialmente no pudo ser probada en su totalidad.

Van den Bogaar y sus colaboradores (2014, p. 15) ensayaron los compuestos por espacio de 72 horas para permitir un mayor efecto de los mismos. Por otra parte, emplearon otro método para la infección de las células y un modelo celular diferente. Estos factores pueden haber influido en la diferencia de resultados obtenidos por estos autores comparados con esta investigación.

La pentamidina, es un compuesto que elimina a los parásitos cuando se encuentran infectando las células. El hecho de que el tratamiento con este compuesto no haya tenido efecto alguno sobre la *Leishmania mexicana* indica que el tiempo de incubación con los compuestos debe ser mayor para permitir una mayor efectividad de la acción de los mismos.

Los problemas técnicos presentados durante el proceso de infección no permitieron determinar la efectividad del compuesto **LD8** como compuesto leishmanicida. Se requieren experimentos concluyentes que validen su actividad y arrojen luz sobre su mecanismo de acción.

## 5 CAPÍTULO VI. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

Todas las bases de Schiff sintetizadas derivadas de 4-aminoantipirina presentan un comportamiento similar frente a *Leptomonas* y *Leishmania mexicana*.

De todos los compuestos ensayados, solamente **LD8** y **LD12** presentaron un efecto frente a *Leishmania mexicana*, sin embargo la actividad leishmanicida es muy baja.

La presencia de un grupo OH en posición *orto* con respecto al imino, sumado a un grupo nitro en posición *meta* respecto a este, juega un papel importante en la actividad de **LD12** sobre el parásito, a diferencia de lo observado en los compuestos **LD2** y **LD3** que presentan estos sustituyentes de forma aislada.

Todos los compuestos probados fueron altamente tóxicos frente a los macrófagos murinos derivados de la médula ósea. La CC<sub>50</sub> obtenida en los ensayos realizados en las células es bajo en comparación con la IC<sub>50</sub> determinada en los ensayos realizados frente a *Leptomonas* y *Leishmania mexicana*.

Los compuestos **LD8** y **LD12** pese a mostrar la mejor actividad biológica frente a *Leishmania mexicana* no se pueden considerar compuestos leishmanicidas promisorios, debido a su baja actividad y alta citotoxicidad.

Tanto la pentamidina y **LD8** son compuestos de acción rápida frente a promastigotes de *Leishmania mexicana*, mientras que **LD12** es un compuesto de acción lenta.

Ninguno de los dos compuestos, **LD8** y **LD12**, produce un efecto en el potencial de membrana de los promastigotes, por lo que su modo de acción frente a estos parásitos no involucra este mecanismo. Se esperaría que vaya por otro mecanismo diferente.

## 5.2 Recomendaciones

Probar el efecto del solvente previo a la implementación de un nuevo protocolo y antes de ensayar los compuestos de interés.

Ensayar diferentes metodologías para transformar los promastigotes en amastigotes axénicos, que permitan estandarizar el método más eficiente para el análisis de la actividad leishmanicida de diferentes compuestos en el laboratorio.

Sintetizar compuestos similares a **LD12** que presenten otros grupos electroaceptores en el anillo aromático y evaluar su actividad frente a los parásitos.

Realizar estudios de estructura-actividad con más compuestos similares a **LD8** para optimizar su respuesta frente a los parásitos y los macrófagos.

Efectuar el estudio de qRT-PCR con el compuesto **LD12** a las 48 horas post tratamiento para observar su efecto en amastigotes intracelulares.

Establecer un protocolo para la infección de los macrófagos que sea más adecuado y que permita obtener un porcentaje más alto de infección.

## REFERENCIAS

- Abdi, Y., Gustafsson, L., Ericsson, O., y Hellgren, U. (1995). *Handbook of Drugs for Tropical Parasitic Infections* (2.<sup>a</sup>ed.). Londres, Reino Unido: Taylor and Francis.
- Alam, M. S., y Lee, D.-U (2011). Synthesis, Molecular Structure and Antioxidant Activity of *(E)*-4-[Benzylideneamino]-1, 5-dimethyl-2-phenyl-1*H*-pyrazol-3(2*H*)-one, a Schiff Base Ligand of 4-Aminoantipyrine. *Journal Chemical Crystallography*, 42(2), 93–102. doi:10.1007/s10870-011-0209-1.
- Alam, M. S., Lee, D.-U., y Bari, L. (2014). Antibacterial and Cytotoxic Activities of Schiff Base Analogues of 4-Aminoantipyrine. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57(5), 613–619. doi:10.1007/s13765-014-4201-2.
- Alam, M., Choi, J., y Lee, D. (2012). Synthesis of novel Schiff base analogues of 4-amino-1, 5-dimethyl-2-phenylpyrazol-3-one and their evaluation for antioxidant and anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 4103–4108. doi:10.1016/j.bmc.2012.04.058.
- Al-Kahraman, Y., Madkour, H., Ali, D., y Yasinzai, M. (2010). Antileishmanial, Antimicrobial and Antifungal Activities of Some New Aryl Azomethines. *Molecules*, 15, 660-671. doi:10.3390/molecules15020660.
- Al-Kahraman, Y., Singh, G., y Yasinzai, M. (2011). Evaluation of *N*-(2-Thienylidene) amines, *N*-(2-Hydroxybenzylidene) amines and 3-Iminoindolin-2-ones as Antileishmanial Agents. *Letters in Drug Design & Discovery*, 8(5), 491-495. doi:10.2174/157018011795514221.
- Alcolea, P., Alonso, A., Gómez, M., Postigo, M., Molina, R., y Jiménez, M. (2014). Stage-specific differential gene expression in *Leishmania infantum*: from the foregut of *Phlebotomus perniciosus* to the human phagocyte. *BMC Genomics*, 15, 849. doi: 10.1186/1471-2164-15-849.
- Azam, F., Singh, S., Khokhra, S., y Prakash, O. (2007). Synthesis of Schiff bases of naphtha [1, 2-d]thiazol-2-amine and metal complexes of 2-(2'-hydroxy) benzylideneaminonaphthothiazole as potential antimicrobial agents. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 8(6), 446-452. doi:

- 10.1631/jzus.2007.B0446.
- Bañuls, A., Hide, M., y Prugnolle, F. (2007). Leishmania and the Leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, 64, 1-458. doi: 10.1016/S0065-308X(06)64001-3.
- Bates, P. (2007). Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37, 1097-1106. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003.
- Bates, P., y Tetley, L. (1993). Leishmania mexicana: Induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. *Experimental parasitology*, 76, 412-423. doi: 10.1006/expr.1993.1050.
- Behrouzi, M., Poorrajab, F., Kaboudanian, S., Emami, S., Shafiee, A., y Foroumadi, A. (2008). Synthesis and in vitro anti-leishmanial activity of 1-[5-(5-nitrofuranyl)-1, 3, 4-thiadiazol-2-yl] - and 1-[5-(5-nitrothiophen-2-yl)-1, 3, 4-thiadiazol-2-yl]-4-arylpiperazines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 4509-4515. doi: 10.1016/j.bmc.2008.02.052.
- Bello, M., Chiaradia, L., Sousa, L., Pacheco, L., Stumpf, T., Mascarello, A., Steindel, M., Yunes, R., Castro, H., Nunes, R., y Rodrigues, C. (2011). Trimethoxy-chalcone derivatives inhibit growth of Leishmania braziliensis: Synthesis, biological evaluation, molecular modeling and structure–activity relationship (SAR). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19, 5046-5052. doi: 10.1016/j.bmc.2011.06.023.
- Berman, J. (1997). Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. *Clinical Infectious Diseases*, 24 (4), 684-703. doi: 10.1093/clind/24.4.684.
- Bhattarai, N., Das, M., Rijal, S., van der Auwera, G., Picado, A., Khanal, B., Roy, L., Speybroeck, N., Berkvens, D., Davies, C., Coosemans, M., Boelaert, M., y Dujardin, J. (2009). Natural infection of Phlebotomus argentipes with Leishmania and other trypanosomatids in a visceral leishmaniasis endemic region of Nepal. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103, 1087-1092. doi: 10.1016/j.trstmh.2009.03.008.
- Bogtish, B., Carter, C., y Oeltmann, T. (2005). *Human Parasitology* (3.<sup>a</sup> ed.). San

- Luis (Misuri), Estados Unidos: Academic Press.
- Brenzan, M., Nakamura, C., Dias, B., Ueda-Nakamura, T., Young, M., García, D. (2007). Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology Research*, 101, 715-722. doi: 10.1007/s00436-007-0542-7.
- Calvopiña, M., Armijos, R. y Hashinguchi, Y. (2004). Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99 (7), 663-672. doi: 10.1590/S0074-02762004000700001.
- Cavalcanti, A., Freire, T., Brito, C., Agra, L., Araújo, J., Bernardino, G., Prado, F., y Alexandre, M. (2014). Antileishmanial Activity of Medicinal Plants Used in Endemic Areas in Northeastern Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 9 (6), 588-596. doi: 10.1155/2014/478290.
- Chan, S. (2013). Enfermedades olvidadas: petición de ayuda. Recuperado el 20 de enero del 2015 de <http://www.ranf.com/enfermedades-olvidadas/noticias-enfermedades/1588-enfermedades-olvidadas-petici%C3%B3n-de-ayuda.html>.
- Croft, S., y Coombs, G. (2003). Leishmaniasis— current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, 19 (11), 502-508. doi: 10.1016/j.pt.2003.09.008.
- Da Silva, C., Da Silva, D., Modolo, L., Alves, R., Resende, M., Martins, C., y Fátima, A. (2011). Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research*, 2, 1-8. doi: 10.1016/j.jare.2010.05.004.
- De Vries, H., y Reedjik, S. (2015). Cutaneous Lishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American Journal of Clinical Dermatology*, 16, 99-109. doi: 10.1007/s40257-015-0114-z.
- Descoteaux, A. y Turco, S. (1999). Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1455, 341-352. doi: 10.1016/S0925-4439(99)00065-4.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 27, 305-

318. doi: 10.1016/j.cimid.2004.03.004.
- Dutta, A., Mandal, G., Mandal, C., y Chatterjee, M. (2007). *In vitro* antileishmanial activity of *Aloe vera* leaf exudate: A potential herbal therapy in leishmaniasis. *Glycoconjugate Journal*, 24, 81-86. doi: 10.1007/s10719-006-9014-z.
- Elemike, E., Oviawe, A., y Otuokere, I. (2011). Potentiation of the Antimicrobial Activity of 4-Benzylimino-2, 3-Dimethyl-1-Phenylpyrazal-5-One by Metal Chelation. *Research. Journal of Chemical Sciences*, 1(8), 6–11.
- Eliot, A., y Kirsch, J. (2004). Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 383 - 415. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074021.
- Gállego, M. (2004). Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 23 (2), 661-676. doi: 10.20506/rst.23.2.1512.
- Gaudiano, G., Valderrama, A., Cárdenas, J. (2015). Leishmaniasis cutánea. A propósito de un caso con buena respuesta al Fluconazol. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 43 (3), 226-228.
- Gois, L., Badaró, R., Schooley, R., y Rios, M. (2015). Immune response to Leishmania antigens in an AIDS patient with mucocutaneous leishmaniasis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS): a case report. *BCM Infectious Diseases*, 15 (38), 1-7. doi: 10.1186/s12879-015-0774-6.
- González, N., Macías, M., López, N., Vázquez, O., y Grajales, A. (2008). Caso clínico de un niño con leishmaniasis visceral en el que se sospechó síndrome mieloproliferaivo. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 22 (85), 32-35.
- González, P., Marín, C., Rodríguez, I., Hitos, A., Rosales, M., Reina, M., Díaz, J., González, A., y Sánchez, M. (2005). In vitro activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 136-141. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.08.010.

- GraphPad Software. (2015). Equation: log (inhibitor) vs. Response – Variable slope. Recuperado el 8 de Junio del 2016 de [http://www.graphpad.com/guides/prism/6/curve-fitting/index.htm?reg\\_dr\\_inhibit\\_variable.htm](http://www.graphpad.com/guides/prism/6/curve-fitting/index.htm?reg_dr_inhibit_variable.htm).
- GraphPad Software. (Version 6.07). (2015) [Software de computador], California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).
- Graziose, R., Rojas, P., Rathinasabapathy, T., Dekock, C., Grace, M., Poulev, A., Lila, M., Smithe, 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, A., Daigle, D., y Floey, K. (2015). Drug safety assessment of oral formulations of ketoconazole. *Expert Opinion on Drug Safety*, 14 (2), 325-334. doi. 10.1517/14740338.2015.983071.
- Gutiérrez, V., Seabra, A., Reguera, R., Khandare, J., y Calderón, M. (2016). New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis. *The Royal Society of Chemistry*, 45, 152-168. doi: 10.1039/C5CS00674K.
- Issa, R., Khedr, A., y Rizk, H. (2005). UV–vis, IR and <sup>1</sup>H NMR spectroscopic studies of some Schiff bases derivatives of 4-aminoantipyrine. *Spectrochimica Acta Part A*, 62, 621-629. doi: 10.1016/j.saa.2005.01.026.
- Jaguin, M., Fardel, O., y Lecureur, V. (2015). AhR-dependent secretion of PDGF-BB by human classically activated macrophages exposed to DEP extracts stimulates lung fibroblast proliferation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 285 (3), 170-178. doi: 10.1016/j.taap.2015.04.007.
- Jeyanthi, D., Livingston, D., y Sheela, C. (2014). Synthesis, spectral characterization and antimicrobial studies of metal (II) complexes of Schiff bases derived from 4-aminoantipyrine and 2-(4-chlorophenyl) chroman-4-one. *International Journal of Pharmaceutical, chemical and biological sciences*, 4 (2), 307-316.
- Kajal, A., Bala, S., Kamboj, S., Sharma, N., y Saini, V. (2013). Schiff Bases: A versatile pharmacophore. *Journal of Catalysts*, 4, 1-14. doi: 10.1155/2013/893512.

- Kato, H., Uezato, H., Katakura, K., Calvopiña, M., Marco, J., Barroso, P., Gomez, E., Mimori, T., Korenaga, M., Iwata, H., Nonaka, S., Hashiguchi, Y. (2005). Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean áreas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72 (1), 87-93.
- Kato, H., Uezato, H., Gomez, E., Terayama, Y., Calvopiña, M., Iwata, H., Hashiguchi, Y. (2007). Establishment of a Mass Screening Method of Sand Fly Vector for *Leishmania* infection by molecular biological methods. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77 (2), 324-329.
- Kato, H., Calvopiña, M., Criollo, H., y Hashiguchi, Y. (2013). First cases of *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* infection in Ecuador and identification of its suspected vector species. *Acta Tropica*, 128 (3), 710-713.
- Keurulainen, L., Heiskari, M., Nenonen, S., Nasereddin, A., Kopelyanskiy, D., Leino, T., Yli-Kauhaluoma, J., Jaffe, C., y Kiuru, P. (2015). Synthesis of carboxyimidamide-substituted benzoi[c] ij 1, 2, 5] oxadiazoles and their analogs, and evaluation of biological activity against *Leishmania donovani*. *The Royal Society of Chemistry*, 6, 1673-1678. doi: 10.1039/c5md00119f.
- Khan, K., Mughal, U., Samreen, Perveen, S., y Choudhary, M. (2008). Schiff Bases of Isthain: Potential anti-leishmanial agents. *Letters in Drug Design & Discovery*, 5, 243-249. doi: 10.2174/157018008784619915.
- Kolliopoulos, A., Kampouris, D., y Banks, C. (2015). Indirect electroanalytical detection of phenols. *Analyst*, 140, 3244-3250. doi. 10.1039/c4an02374a.
- Kumar, A. (2013). *Leishmania and leishmaniasis*. New York, Estados Unidos: Springer briefs in immunology, Springer-Verlag.
- Kumar, S., Nath, D., y Saxena, P. (2009). Applications of metal complexes of Schiff bases- A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 68, 181-187.
- Largerón, M. (2013). Protocols for the Catalytic Oxidation of Primary Amines to Imines. *European Journal of Organic Chemistry*, 24, 5225-5235. doi: 10.1002/ejoc.201300315.
- Layer, R. W. (1966). The Chemistry of Imines. *Chemical Reviews*, 63(5), 489–510. doi:10.1021/cr60210a001

- Marín, C., Ramírez, I., Rosales, M., Muro, B., Reviriego, F., Navarro, P., Arán, V., y Sánchez, M. (2015). *In vitro* leishmanicidal activity of 1, 3-disubstituted 5-nitroindazoles. *Acta Tropica*, 148, 170-178. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.04.028.
- Marković, V., Erić, S., Juranić, Z., Stanojković, T., Joksović, L., Ranković, B., Kosanić, M., y Joksović, D. (2010). Synthesis, antitumor activity and QSAR studies of some 4-aminomethylidene derivatives of edaravone. *Bioorganic Chemistry*, 39, 12-27. doi: 10.1016/j.bioorg.2010.10.003.
- Mentink, M., y Moseer, D. (2001). The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *Journal of Immunology*, 166, 1141-1147. doi: 10.4049/jimmunol.166.2.1141.
- Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. (2001). Manual de diagnóstico y tratamiento de las leishmaniasis. Recuperado de [http://www.imt.edu.py/admin/uploads/Documento/manual\\_leish.pdf](http://www.imt.edu.py/admin/uploads/Documento/manual_leish.pdf).
- Ministerio de Salud Pública (2015). Gaceta epidemiológica semanal No. 53. Recuperado el 7 de Julio del 2016 de <http://instituciones.msp.gob.ec/images/Documentos/gaceta/GACETA%20SE%2053.pdf>.
- Mohapatra, S. (2014). Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Tropical Parasitology*, 4(1), 4-9. doi: 10.4103/2229-5070.129142.
- Montalván, J. (2013). Proyecto de vigilancia y control de vectores para la prevención de la transmisión de enfermedades metaxénicas en el Ecuador. 2013-2017. Recuperado el 7 de Julio del 2016 de <http://instituciones.msp.gob.ec/dps/snem/images/proyectocontroldevectorismetaxenicas.pdf>.
- Nikzad, S., Baradaran, M., y Nasri, P. (2014). Dose-response modeling using MTT assay- a short review. *Life Science Journal*, 11 (9s), 432-437.
- Oliviera, A., Aparecida, E., Bianco, E., Ueda-Nakamura, T., Prado, B., Crespo, R., y Vataru, C. (2011). 4-Acetoxydolastane Diterpene from the brazilian Brown alga *Canistrocarpus cervicornis* as antileishmanial agent. *Marine Drugs*, 9, 2369-2383. doi: 10.3390/md9112369.
- Organización Mundial de la Salud. (2010). Control de las Leishmaniasis.

- Recuperado el 19 de enero del 2016 de [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/82766/1/WHO\\_TRS\\_949\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/82766/1/WHO_TRS_949_spa.pdf)
- Pedrique, B., Strub, N., Some, C., Oliario, P., Trouller, P., Ford, N., Pécoul, B., y Bradol, J. (2013). The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000-11): a systematic assessment. *The Lancet Global Health*, 1 (6), e371-e379. doi: 10.1016/S2214-109X(13)70078-0.
- Perentena, L., González, C., Celis, B., Valbuena, A., y Colina, M., (2015). Síntesis de bases de Schiff derivadas del quitosano por reacción con *p*-Dimetilaminobenzaldehído y 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 16(1), 1-27.
- Pérez, C., Solías, Y., y Rodríguez, G. (2006). Leishmaniasis cutánea difusa en un paciente con sida. *Biomédica*, 26 (4), 485-497. doi: 10.7705/biomedica.v26i4.314.
- Plock, A., Sokolowska-Köeler, 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.
- Polonio, T., y Efferth, T. (2008). Leishmaniasis: Drug resistance and natural products (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 22, 277-286. doi: 10.3892/ijmm\_00000020.
- Qin, W., Long, S., Panunzio, M., y Biondi, S. (2013). Schiff Bases: A short survey on an evergreen chemistry tool. *Molecules*, 18, 12264-12289. doi: 10.3390/molecules181012264.
- Rábago, J., Asz, D., López, L., Baquera, J., Solloa, M., Arenas, R., y Jáuregui, L. (2006). Leishmaniasis cutánea. Reporte de un caso. *Medicina Internacional de México*, 22, 343-346.
- Raman, N., Johnson, R., y Sakthivel, A. (2009). Transition metal complexes with Schiff base ligands: 4-aminoantipyrine based derivatives-a review. *Journal of Coordination Chemistry*, 65 (5), 691-709. doi: 10.1080/00958970802326179.
- Reithinger, R., Dujardin, J., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., y Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7 (9),

- 581-596. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70209-8.
- Remão, J., Miguel, D., Taniwaki, N., Trinconi, C., Yokoyama, J., y Uliana, S. (2014). Antileishmanial activity of the estrogen receptor modulator raloxifene. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8 (5), 1-11. doi: 10.1371/journal.pntd.0002842.
- Satoskar, A., y Durvasula, R. (2014). *Pathogenesis of Leishmaniasis: New developments in research*. Nueva York, Estados Unidos: Springer.
- Selvapandiyan, A., Ahuja, K., Puri, N., y Krishnan, A. (2015). Implications of co-infection of *Leptomonas* in visceral leishmaniasis in India. *Parasitology*, 142, 1657-1662. doi: 10.1017/S0031182015001389.
- Shoab, M., Rahman, G., Ali, S., y Naveed, M. (2015). Synthesis of 4-aminoantipyrine derived Schiff bases and their evaluation for antibacterial, cytotoxic and free radical scavenging activity. *A Journal of the Bangladesh Pharmacological Society*, 10, 332-336. doi: 10.3329/bjp.v10i2.22471.
- Shujha, S., Shah, A., Rehman, Z., Muhammad, N., Ali, S., Qureschi, R., Khalid, N., y Meetsma, A. (2010). Diorganotin(IV) derivatives of ONO tridentate Schiff base: Synthesis, crystal structure, in vitro antimicrobial, anti-leishmanial and DNA binding studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 2902-2911. doi: 10.1016/j.ejmech.2010.03.015.
- Singh, N., Kumar, M., y Singh, R. (2012). Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 485-497. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60084-4.
- Singh, S., y Sivakumar, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 10 (6), 307-315. doi: 10.1007/s10156-004-0348-9.
- SPSS Statistics (Version 23.0) (2015). [Software de computador], Chicago, USA, www.ibm.com.
- Sun, J., Kim, D., Guo, Y., Teng, Z., Li, Y., Zheng, L., Zhang, Z., Larson, A., y Lu, G. (2014). (RGDfE) conjugates multi-Functional nanomedicine delivery system for targeted pancreatic cancer therapy. *Journal of Material Chemistry B*, 3, 1049-1058. doi: 10.1039/C4TB01402B.
- Teixeira, D., Benchimol, M., Rodrigues, J., Crepaldi, P., Pimenta, P., y Souza, W.

- (2013). The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. *PLoS Pathogens*, 9(10). doi: 10.1371/journal.ppat.1003594.
- Van den Bogaart, E., Schoone, G., Adams, E., y Schalling, H. (2014). Duplex quantitative Reverse-Transcriptase PCR for simultaneous assessment of drug activity against *Leishmania* intracellular amastigotes and their host cells. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4, 14-19. doi: 10.1016/j.ijpddr.2013.11.001.
- Van de Ven, H., Vermeersch, M., Vandenbroucke, R., Matheussen, A., Apers, S., Weyenberg, W., De Smedt, S., Cos, P., Maes, L., y Ludwig, A. (2012). Intracellular drug delivery in *Leishmania*-infected macrophages: Evaluation of saponin-loaded PLGA nanoparticles. *Journal of Drug Targeting*, 20 (2), 142-154. doi: 10.3109/1061186X.2011.595491.
- Vermeersch, M., da Luz, R., Toté, K., Timmermans, J., Cos, P., y Maes, L. (2009). In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (9), 3855-3859. doi: 10.1128/AAC.00548-09.