



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Efecto de la 7-cloroquinolina-4-oxifenil (2-metoxi-5-carboxialdehido) sobre *Leishmania donovani* y *Leishmania braziliensis*

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre

Universidad Central de Venezuela

Por la bachiller Inaira del Carmen Rivero Vásquez

Como requisito parcial para optar al título

De licenciada en Biología

Tutora: Dra. Elizabeth Valdivieso

Caracas, Venezuela.

Octubre, 2017

CONSTANCIA DE APROBACIÓN



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DEL BR. INAIRA DEL CARMEN RIVERO VÁSQUEZ

Quienes suscriben, miembros del Jurado designado por el Consejo de la Escuela de Biología para examinar el Trabajo Especial de Grado presentado por el Br. Inaira del Carmen Rivero Vásquez, C.I. V-22.905.086, titulado: "Efecto de la 7-cloroquinolina -4-oxifenil (2-metoxi-5-carboxialdehído) sobre *Leishmania donovani* y *Leishmania braziliensis*" para optar al título de Licenciado en Biología, consideramos que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos por los reglamentos respectivos de la Universidad Central de Venezuela y por lo tanto lo declaramos APROBADO con una calificación de veinte (20) puntos.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 9 días del mes de octubre del año 2017.

Dra. Zelandia Fermin (Biomedicina-UCV)

Jurado

Dr. Alexis Mendoza (IBE-UCV)

Jurado

Dra. Elizabeth Valdivieso (IBE-UCV)

Tutor

DEDICATORIA

A la memoria de mis abuelos Flor y Antonio

AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgen del Carmen, por bendecirme y acompañarme en el camino para lograr esta meta.

A mis padres y mi hermano, por estar incondicionalmente, apoyarme en todas las decisiones del camino y darme ánimo para seguir adelante en los momentos difíciles.

A la ilustre Universidad Central de Venezuela por permitirme formarme como profesional, vivir diferentes experiencias y hacer grandes amistades a lo largo de los años, especialmente agradezco a la Escuela de Biología, pues tuve la dicha de contar con excelentes profesores tanto en el ámbito académico como en el profesional.

A la Dra. Elizabeth Valdivieso, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme realizar este trabajo bajo su tutela, por todas sus enseñanzas, paciencia y cariño, que me hicieron crecer profesional y personalmente.

A mis amigos y compañeros de carrera: Radharani, Estefanía, Jose, Nani, Katiuska, Rosamar, Alejandro, Sol, Jeniree, gracias por las risas, los consejos y el apoyo, ustedes hicieron mi días más felices y los tiempos difíciles más amenos.

Al Dr. Gustavo Benaim así como al grupo de trabajo del Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos del Instituto de Estudios Avanzados, por permitirme usar las instalaciones de su laboratorio para cumplir los objetivos de este trabajo especialmente a Jessica Rodriguez y Andrea Pinto, por su gran ayuda y amistad.

A la Dra. Francehuli Dagger y Carolina Bernal, por su disposición en aclarar todas las dudas y sus consejos en cuanto al escrito y presentación del trabajo.

A los licenciados Fabiola Mejías y Carlos Torrealba, por enseñarme todo lo referente al cultivo de parásitos y macrófagos, y por toda la ayuda y consejos que me brindaron a lo largo de la fase experimental del trabajo.

A todos aquellas personas, que de alguno u otra manera me acompañaron y ayudaron a lo largo de este camino. ¡Muchas gracias!

RESUMEN

Se conoce como leishmaniasis a un grupo de enfermedades producidas por diferentes especies de protozoarios del género *Leishmania*. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el 2016, se estima que cada año se producen entre 900 000 y 1,3 millones de nuevos casos y entre 20 000 y 30 000 defunciones a causa de esta enfermedad. En Venezuela, según lo reportado en el boletín epidemiológico publicado a finales del año 2016, hay un total de 1 068 casos de esta enfermedad por lo que es considerada una de las enfermedades tropicales de mayor importancia. El tratamiento actual de la enfermedad está constituido por fármacos altamente tóxicos, que suelen generar resistencia en los pacientes y son de eficacia variable dependiendo de la especie que se trate, por lo cual diversas investigaciones se han abocado a la búsqueda de nuevos compuestos con potencial leishmanicida. En este trabajo se recopilan las evidencias que apoyan a los compuestos quinolínicos y sus derivados como posibles drogas alternativas para esta enfermedad, ya que estos han demostrado su efecto *in vitro* e *in vivo* contra el parásito. Basados en esta evidencia, se evaluó el efecto del compuesto 7-cloroquinolina-4-oxifenil(2-metoxi-5-carboxialdehído) o FR25 sobre promastigotes y amastigotes *Leishmania braziliensis* y *Leishmania donovani*. Se obtuvo que la quinolina FR25 afecta la viabilidad *in vitro* de los promastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis* con un valor IC₅₀ estimado de 11,43 µM en el caso de *L. donovani* y de 60,08 µM para *L. braziliensis*. Además, este mismo compuesto fue capaz de disminuir el porcentaje de infección de macrófagos murinos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. donovani*, de manera dosis dependiente con un valor IC₅₀ estimado de 1,59µM y de disminuir del número de amastigotes por célula, llegando a observarse vacuolas vacías a altas concentraciones de la droga. En el caso de infección por amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, a concentraciones tan altas como 28 µM, las cuales ya afectan a la célula hospedera, el compuesto no fue competente en reducir el porcentaje de infección ni siquiera en un 50%. El presente trabajo demuestra que existen diferencias importantes en el efecto que tiene un mismo compuesto sobre distinta especies, y además señala a las quinolinas como potenciales candidatos a drogas leishmanicidas.

Palabras claves: *Leishmaniasis*, *quinolinas*, *Leishmania braziliensis*

ÍNDICE GENERAL

CONSTANCIA DE APROBACIÓN.....	.ii
DEDICATORIA.....	.iii
AGRADECIMIENTOS.....	.iv
RESÚMEN.....	.v
ÍNDICE GENERAL.....	.vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	.viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	.xi
ABREVIATURAS.....	.x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Leishmaniasis.....	1
1.2. Formas clínicas de las leishmaniasis.....	2
1.3. Tratamiento actual.....	4
1.4. Otros compuestos con actividad antileishmania.....	6
1.5. Quinolinas.....	9
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo general.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. Cultivos celulares.....	14
3.1.1 Cultivo de promastigotes.....	14
3.1.2 Cultivo de macrófagos.....	14
3.2 Compuestos a evaluar.....	15
3.3 Ensayo de citotoxicidad del compuesto FR25 sobre promastigotes de <i>L. donovani</i> y <i>L. braziliensis</i>	15
3.4 Efecto del compuesto FR25 sobre el porcentaje de infección de amastigotes de <i>L. donovani</i> y <i>L. braziliensis</i> a macrófagos múridos de la línea celular J774.....	16

4.	RESULTADOS.....	19
4.1	Efecto del compuesto FR25 sobre la viabilidad de promastigotes de <i>L. donovani</i> y <i>L. braziliensis</i>	19
4.2	Efecto del compuesto Anfotericina B (AmB) sobre la viabilidad de promastigotes de <i>L. donovani</i> y <i>L. braziliensis</i>	19
4.3	Efecto del compuesto FR25 sobre el porcentaje de infección por amastigotes de <i>L. donovani</i> y <i>L. braziliensis</i> a macrófagos múridos de la línea celular J774.....	21
4.4	Efecto de Anfotericina B (AmB) sobre el porcentaje de infección por amastigotes de <i>L. donovani</i> y <i>L. braziliensis</i> a macrófagos múridos de la línea celular J774.....	26
5.	DISCUSIÓN.....	28
6.	CONCLUSIONES.....	34
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto del compuesto FR25 sobre la viabilidad de (A) <i>Leishmania donovani</i> (B) <i>Leishmania braziliensis</i>	19
Figura 2: Efecto de anfotericina B (AmB) sobre la viabilidad de (A) <i>Leishmania donovani</i> (B) <i>Leishmania braziliensis</i>	20
Figura 3: Efecto del compuesto FR25 sobre el porcentaje de infección por amastigotes de (A) <i>L. donovani</i> y (B) <i>L. braziliensis</i> a macrófagos múridos de la línea celular J774.....	21
Figura. 4: Efecto de FR25 sobre el porcentaje de infección de amastigotes de <i>L. donovani</i> .(A) Control sin infectar; (B) Control infectado; (C) 0,25 μ M FR25; (D) 0,5 μ M FR25; (E) 1 Mm FR25; (F) 3 μ M FR25; (G) 6 μ M FR25; (H) 10 μ M FR25.....	24
Figura 5: Efecto de FR25 sobre el porcentaje de infección de amastigotes de <i>L. braziliensis</i> (A) Control sin infectar; (B) Control infectado; (C) 10 μ M FR25; (D) 13 μ M FR25; (E) 17 μ M FR25; (F) 21 μ M FR25; (G) 24 μ M FR25; (H) 28 μ M FR25.....	25
Figura 6: Efecto de la Anfotericina B (AmB) sobre el porcentaje de infección por amastigotes de (A) <i>L. donovani</i> y (B) <i>L. braziliensis</i> a macrófagos múridos de la línea celular J774.....	27

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunas especies de <i>Leishmania</i> según la manifestación clínica que generan en humanos.....	2
Tabla 2. Compuestos sintéticos con actividad Anti- <i>Leishmania</i>	7
Tabla 3: Efecto del compuesto FR25 sobre el porcentaje de infección por amastigotes de <i>L. donovani</i> a macrófagos múridos de la línea celular J774.....	21
Tabla 4: Efecto del compuesto FR25 sobre el porcentaje de infección por amastigotes de <i>L. braziliensis</i> a macrófagos múridos de la línea celular J774.....	22

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AmB: Anfotericina B

ATP: Adenosina Trifosfato

COL.: Colaboradores

DE: Desviación estándar

DMSO: Dimetil-sulfóxido

ED₅₀: Concentración que causa efecto deseado al 50% de una población

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

IC₅₀: Concentración inhibitoria del 50% de la población

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

ml: Mililitro

mM: Milimolar

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazolio

nM: Nanomolar

OMS: Organización Mundial de la Salud

SFB: Suero Fetal Bovino

μM: Micromolar

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Leishmaniasis

Se conoce como leishmaniasis a un grupo de enfermedades producidas por diferentes parásitos protozoarios del género *Leishmania*. Se han identificado aproximadamente 30 especies dentro de este género, siendo al menos 20 de estas patógenas para mamíferos (Spickler y col., 2011). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el 2016, se estima que cada año se producen entre 900 000 y 1,3 millones de nuevos casos y entre 20 000 y 30 000 defunciones a causa de esta patología. En Venezuela, según lo reportado en el boletín epidemiológico publicado a finales del año 2016, hay un total de 1 068 casos de esta enfermedad. Dado a su alta incidencia y mortalidad, esta enfermedad es considerada un problema de salud pública en distintos países.

Los parásitos del género *Leishmania* se desarrollan y multiplican en el interior de macrófagos del hospedador vertebrado como formas amastigotes, y como promastigotes en la luz del tubo digestivo del vector, insectos del género *Lutzomyia* en el caso América y *Phlebotomus* para el viejo mundo. Los amastigotes son ovalados y miden de 2 a 5 micras, su flagelo es corto, por lo que sólo es visible con microscopía electrónica, mientras que los promastigotes son alargados, miden entre 10 y 15 micras, y cercano al extremo anterior se puede observar el kinetoplasto, de donde sale el flagelo, que le confiere movimiento (Botero, 1998).

El ciclo de vida de este protozoario inicia cuando el vector ingiere sangre de un hospedador infectado, una vez que los parásitos se encuentran en el intestino medio del insecto, se diferencian en varias etapas de desarrollo pasando de amastigotes a

promastigotes metaclíclicos con diferentes etapas intermedias, las cuales se caracterizan por cambios morfológicos y funcionales del parásito destinados a garantizar su supervivencia en el vector. (Kamhawi, 2006). Los promastigotes metacíclicos se acumulan en el intestino anterior e intestino medio del vector, el cual al alimentarse de un vertebrado, inyecta los parásitos sobre su piel, donde son fagocitados por macrófagos, pasando así a la forma amastigote, y posteriormente replicándose hasta que la célula hospedera se lisa, liberando nuevos individuos que infectarán a otros macrófagos (Sharma y Singh, 2008). El ciclo se reanuda una vez que el vector se alimenta de un mamífero sano.

1.2 Formas clínicas de la Leishmaniasis

En humanos las manifestaciones clínicas de la enfermedad, dependen de la especie de *Leishmania* y de la respuesta inmunitaria del individuo afectado (Nieves y col., 2007). Entre las principales formas clínicas encontramos: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV). En la tabla 1 se muestran las distintas especies de *Leishmania* que afectan a humanos según la manifestación clínica que genera.

Tabla 1. Algunas especies de *Leishmania* según la manifestación clínica que generan en humanos. (OMS, 2010).

Subgénero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Viejo mundo	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
Nuevo mundo (América)	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guayanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. peruviana</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Manifestación clínica	Visceral	Cutánea	Cutánea	Mucocutánea

La **leishmaniasis cutánea** se caracteriza por laceraciones en la piel, principalmente en cara, brazos y piernas. Una lesión típica comienza como un nódulo en el sitio de inoculación que crece lentamente, y puede convertirse en una úlcera la cual se cura gradualmente dejando una cicatriz (OMS, 2010). Esta forma es la más común y a menudo se cura de manera espontánea, sin embargo las lesiones pueden llegar a ser destructivas e incluso incapacitantes.

En el caso de la **leishmaniasis mucocutánea**, las lesiones son consecuencia de diseminación linfática o hematógena hacia las mucosas, cuando previamente se ha tenido lesión cutánea (Salazar y Castro, 2001), causada por algunas de las especies mencionadas en la tabla 1. Estas lesiones pueden aparecer meses o años después de la manifestación cutánea, causando la destrucción de las membranas mucosas de la nariz, boca y garganta, llegando a comprometer la respiración y la alimentación del afectado.

La **leishmaniasis visceral**, es consecuencia de la migración de los parásitos por medio de la circulación sanguínea o linfática, hacia órganos internos como el bazo, el hígado, la médula ósea, los ganglios linfáticos y otros tejidos linfoides (OMS, 2010). El período de incubación que puede ser de meses o años, y la mayoría de los casos permanece de forma asintomática o asociada con síntomas leves. Sin embargo, esta es la forma más grave de la enfermedad y generalmente es fatal si no es tratada.

1.3 Tratamiento actual

El tratamiento actual de esta enfermedad incluye, como primera línea de acción, el uso de antimoniales pentavalentes (estibogluconato de sodio y el antimoniato de N-metilglucamina) los cuales han sido usados desde la década de 1940. El metabolismo y

mecanismo de acción de estos fármacos contra *Leishmania* no es totalmente comprendido, se ha propuesto que estos compuestos están asociados al bloqueo de la glicólisis, metabolismo de ácidos grasos y la formación de ATP (Nieves y col., 2007). Sin embargo son altamente tóxicos y algunos pacientes no responden al tratamiento o generan resistencia al mismo (De Menezes y col., 2015).

Como tratamiento de segunda línea en los casos que se presente resistencia a los antimoniales, se emplean otras drogas como la anfotericina B, la paramomicina la pentamidina, y recientemente la miltefosina. La anfotericina B (AmB) es un antibiótico poliénico utilizado para el tratamiento de infecciones fúngicas, sin embargo, ha sido utilizado desde 1960 por vía parenteral como deoxicolato, y desde 1997 en liposomas para el tratamiento de la leishmaniasis (Nieves y col., 2007). La anfotericina B muestra alta afinidad por el ergosterol, el esteroles predominante en la membrana de hongos y protozoarios como *Leishmania*, lo que genera la formación de poros acuosos en la membrana del parásito que resultan en cambios osmóticos y finalmente en la lisis celular (Ramos, 1996). A pesar de la eficacia de este fármaco su administración está asociada a severos efectos secundarios como nefrotoxicidad, además se han reportado desarrollo de resistencia por parte del parásito (De Menezes y col., 2015).

La paramomicina es un antibiótico aminoglicosídico usado contra organismos como bacterias gram-positivas y gram-negativas, así como infecciones parasíticas entre las que se incluyen giardiasis y amibiasis. Su mecanismo de acción es poco claro, sin embargo se ha observado que en su forma catiónica se une a las cargas negativas del glicocálix, y entra por endocitosis a la célula, una vez en el interior celular, es posible que su blanco sea la

mitocondria (Jhingran y col., 2009). Además inhibe la translocación de las subunidades ribosomales y por tanto la síntesis de proteínas (Singh y col., 2012).

Por otro lado, la pentamindina, una diamina aromática, fue una de las primeras drogas en emplearse como tratamiento ante la resistencia de los antimoniales. Se plantea que su actividad leishmanicida está relacionada a la disminución del potencial mitocondrial, ya que esta droga se acumula en la mitocondria y disminuye la eficiencia del complejo II de la cadena respiratoria (Singh y col., 2012).

La miltefosina es un fosfolípido acilado inicialmente utilizado como un agente antitumoral, y es la primera droga de administración oral para esta patología. Su mecanismo de acción está asociado a cambios en el metabolismo de lípidos acilados y en la síntesis de fosfolípidos (Ouellette y col., 2004). A pesar de su efectividad contra la enfermedad, este fármaco es altamente teratogénico y tiene una vida media larga que predispone al desarrollo de resistencia (Soto J. y Soto P., 2006).

A pesar de existir distintos fármacos capaces de combatir la enfermedad, el éxito de la quimioterapia varía por diversos factores, como el lugar donde se infecta el individuo y el estado nutricional e inmunológico del mismo (Nieves y col., 2007). Además se ha reportado que hay diferencias en la sensibilidad a los fármacos entre las distintas especies del género *Leishmania*. Escobar y col. en el 2002 reportan diferencias en la sensibilidad *in vitro* de promastigotes y amastigotes de las especies *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, y *L. panamensis*, hacia la miltefosina, teniendo valores de ED₅₀ entre 0,36-13,1 μM en promastigotes y 2,63-37,57 μM en amastigotes, siendo *L. donovani* la especie más susceptible a este fármaco. Otro estudio llevado a cabo con aislados

provenientes de pacientes humanos en Perú y Nepal, también demostró que distintas especies de *Leishmania* presentan diferencias en la sensibilidad hacia la miltefosina. En este caso, los aislados de las especies *L. braziliensis* y *L. guayanensis* demostraron ser menos sensibles a la miltefosina (ED_{50} superiores a los $30\mu\text{M}$) que las especies *L. donovani* y *L. lainsoni*, quienes mostraron valores de ED_{50} por debajo de $5\mu\text{M}$ (Yardley y col., 2005).

1.4 Otros compuestos con actividad antileishmania

La búsqueda de nuevos compuestos con potencial leishmanicida que conlleven a una terapia que disminuya los efectos secundarios, no genere resistencia en el parásito, sea efectiva a bajas dosis y efectiva en un amplio rango de especies dentro del género, es el objetivo de un gran número de grupos de investigación en el área. Nuevas drogas han sido diseñadas gracias a los avances de distintas tecnologías y a los crecientes descubrimientos respecto a las rutas metabólicas y el genoma de *Leishmania*. Estas moléculas interfieren en la actividad biológica de distintos blancos moleculares del parásito, los cuales pueden actuar como inhibidores de su proliferación sin dañar al hospedero.

Una cantidad considerable de drogas potenciales han sido evaluadas, encontrándose distintas dianas efectivas, como las que se exponen en la tabla 2, siendo las que más resaltan inhibidores de distintas enzimas y rutas metabólicas que interfieren con la proliferación del parásito.

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

Compuesto	Diseño de la droga	Actividad Anti-Leishmania
3-quinolinas sustituidas	Potente activador de macrófagos	Efecto <i>in vitro</i> contra promastigotes y amastigotes de <i>L. chagasi</i>
9,9-dimetilxantina triciclica	Inhibidor de la tripanotiónreductasa	Inhibe la proliferación <i>in vitro</i> de amastigotes intracelulares de <i>L. donovani</i>
Azasteroles	Inhibidor de la 24-metiltransferasa	Muestra actividad contra promastigotes y amastigotes axénicos de <i>L. amazonensis</i>
Edelfosina e ilmofosina	Nuevo derivado de alquil-fosfolípido	Alta actividad <i>in vitro</i> contra promastigotes y amastigotes de <i>L. donovani</i>
N-acetil-l-cisteina	Precursor de glutatión	Muestra actividad <i>in vitro</i> contra <i>L. amazonensis</i> en ratones BALC/c
Nicotinamida	Inhibidor de ciertas deacetilasas III dependientes de NAD	Causa inhibición <i>in vitro</i> de la proliferación en promastigotes y amastigotes de <i>L. infantum</i>
Perifosina	Nuevo derivado alcaloide	Muestra una actividad significativa contra promastigotes de <i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. major</i> y <i>L. infantum</i>
Triazoles SCH 56592	Inhibidores de la ruta biosintética de ergosterol	Exhibe actividad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> contra <i>L. amazonensis</i> y <i>L. donovani</i>

Entre las distintas fuentes de las cuales han sido extraídos estos compuestos sintéticos, una de las más importantes son las plantas. Según la OMS aproximadamente el 11% de los 252 fármacos considerados como esenciales, tienen su origen exclusivamente en plantas con flores (Veeresham, 2012). Además se han investigado muchas otras moléculas derivadas de las plantas que pueden servir como modelos químicos o plantillas para el diseño, síntesis y semi-síntesis de nuevas sustancias que sean útiles en el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas la leishmaniasis (Veeresham, 2012).

Uno de los trabajos pioneros que demuestra el potencial de diversas plantas como drogas leishmanicidas fue realizado sobre un modelo *in vivo*, por Singha y col. en 1992, en

el cual se evaluó el efecto de extractos crudos provenientes de 23 plantas distintas en hámsteres infectados con *Leishmania donovani*, encontrando que de los extractos evaluados, provenientes de cinco plantas (*A. schalaris*, *S. chirata*, *T. semidecandra*, *T. cardifoliay N. arbortristis*) disminuyeron la carga parasitaria en el bazo por encima del 75% al cabo de 28 días después el tratamiento.

En los años siguientes, diversas investigaciones han comprobado la actividad leishmanicida que tienen distintas plantas. Estas no sólo se han abocado a estudiar el efecto que tiene la planta sobre el parásito, sino también a identificar los distintos metabolitos presentes en las mismas, quienes son los verdaderos responsables de su actividad antiparasitaria. Una larga lista de metabolitos ha sido generada, con al menos 239 moléculas distintas (Rocha, 2005) clasificadas según la naturaleza química de las mismas. Entre aquellos compuestos a los cuales se ha confirmado su actividad leishmanicida, se encuentran diversos **flavonoides**, como la luteonina y la quercetina que se ha descrito son capaces de provocar el clivaje del minicírculo de ADN del kinetoplasto mediante la inducción de la topoisomerasa II tanto en promastigotes como amastigotes (Polonio y Efferth, 2008). Las **chalconas**, como la licochalcona A, exhibe una fuerte actividad anti-leishmania contra promastigotes y amastigotes, siendo capaz de alterar la ultraestructura de la mitocondria (Polonio y Efferth, 2008). Los **terpenoides** quienes representan uno de los más diversos metabolitos extraídos de productos naturales, destacan los iridoides, como los aislados de la planta *Nyctanthes arbortristisde*, quienes disminuyen *in vitro* el porcentaje de infección así como el número de amastigotes de *L. donovani* por macrófago (Tandon y col., 1991). Algunas otras moléculas como lignanos, cumarinas, iridoides, monoterpenos,

saponinas, toxoides, quinolinas, etc. también se ha reseñado actividad anti-leishmania (Wink, 2012).

1.5 Quinolinas

Las quinolinas son compuestos orgánicos heterocíclicos formados por un anillo de benceno y uno de pirimidina. Modificaciones sobre la estructura base de esta molécula dan origen a otros compuestos que exhiben una amplia actividad biológica, entre los que resaltan aquellos con potencial leishmanicida, analgésico, hipotensor, amebicida, virucida, etc. (Kouznetsov, 1999). En consecuencia, conjuntos de moléculas son candidatas de alto potencial para el diseño de fármacos contra distintas enfermedades.

Entre los derivados quinolínicos más destacados por su efecto leishmanicida se encuentra la sitamaquina. La sitamaquina es una 8-aminoquinolina de administración oral cuyo mecanismo de acción involucra la interacción electrostática entre las cabezas de fosfolípidos aniónicos y polares, y la carga positiva de la molécula, haciendo que la misma se inserte en la membrana celular del parásito (Dueñas-Romero y col., 2007) afectando así su movilidad, morfología y crecimiento. Ensayos clínicos en India y Kenya con pacientes afectados por la leishmaniasis visceral, demostraron una disminución de la carga parasitaria en los individuos tratados con sitamaquina, así como una buena tolerancia al fármaco (Loiseau y col., 2011). Sin embargo esta droga sigue en estudio pues aún no se ha determinado la dosis ideal que evite sus efectos secundarios.

Otras sustituciones al núcleo quinolínico se han realizado y probado contra el parásito. En el 2005, Tempone y col., describen la síntesis de cuatro 3-quinolinas sustituidas y prueban su actividad antileishmania contra promastigotes y amastigotes de *L.*

chagasi. Estos autores encontraron que los cuatro distintos derivados quinolínicos son capaces de disminuir la proliferación de los promastigotes a bajas concentraciones y de manera dosis-dependiente. El compuesto más activo fue el 3b (2-metil-3-[2E-3fenilprop-2-enil]quinolina-4-ol) con un valor de IC₅₀ de 0,091 μg/mL, mostrando una actividad 20 veces mayor que el reportado para la pentamidina (IC₅₀=2,02 μg/mL). Este mismo compuesto fue el único entre los evaluados que mostró una reducción significativa del número de intracelular de amastigotes en macrófagos, con un IC₅₀ de 3,55 μg/ml, un valor 8 veces menor que el glucantime (IC₅₀=29,55 μg/mL).

Por otra parte, Fournet y col. en 1993 evaluaron la actividad de doce 2-quinolinas sustituidas aisladas de la planta *Galipea longiflora* sobre ratones infectados con *Leishmania amazonensis* y *Leishmania venezuelensis*, ambas especies causantes de la leishmaniasis cutánea. En el caso de infección por *L. amazonensis*, la 2-n-propilquinolina y la chimanina D (2-(1',2'-trans-epoxypropil)quinolina) mostraron ser más potentes que el N-metil-glucantime en cuanto a la reducción de la lesión cutánea causada por este parásito, mientras que en el caso de infección por *L. venezuelensis*, sólo el compuesto 2-n-propilquinolina presentó un efecto significativo, siendo tan efectivo como el N-metil-glucantime en la reducción de la lesión. Es importante resaltar que ninguno de los derivados quinolínicos probados generó señales de obvias de toxicidad en los ratones tratados.

Lackovic y col. en 2010, al hacer un barrido virtual de una serie de compuestos, reporta que 223 moléculas, entre ellas diversos derivados quinolínicos, son capaces de inhibir la GDP-manosa-pirofosforilasa, una enzima fundamental para establecer la infección y para la supervivencia del amastigote en el macrófago. Basados en la actividad inhibitoria de estos compuestos contra la mencionada enzima, los investigadores estudiaron

el efecto un grupo de 20 de estas moléculas sobre la proliferación del parásito. Los autores reportan que entre todos los compuestos que inhiben la actividad de esta enzima, los derivados quinolínicos tenían una alta actividad anti-proliferativa contra promastigotes de *L. major* y baja citotoxicidad en fibroblastos. Específicamente, el derivado quinolínico de la familia 4-pirizin-4-yl-quinolinas presentó una mayor actividad antiproliferativa, reportándose un valor de IC₅₀ de 21,9 μM en amastigotes, mientras que en fibroblastos humanos solo se observaron efectos citotóxicos a concentraciones mayores de 100μM.

Estos trabajos demuestran que las quinolinas pueden ser usadas como estructura principal para el diseño y síntesis de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria, ya que muestran ser efectivos contra los distintos morfotipos de *Leishmania* sin mostrar altas señales de citotoxicidad en las células hospederas, por tanto pueden ser considerados una alternativa importante para hacer frente a la leishmaniasis.

En nuestro laboratorio, se estudió el efecto de una serie de 7-cloroquinolinas-4-oxifenil sustituidas, compuestos semisintéticos derivados de diversas modificaciones de cicloadición del eugenol extraído del aceite esencial de la planta *Eugenia caryophyllus*, sobre *Leishmania mexicana* (Torrealba, 2015). En este trabajo, se evaluó la actividad leishmanicida del compuesto C₁₆H₁₀ClNO₂ y cinco distintas modificaciones sobre esta molécula, encontrando que la 7-cloroquinolina-4-oxifenil(2-metoxi-5-carboxialdehído), de fórmula molecular C₁₇H₁₂ClNO₃, y denominada FR25, fue la más competente en inhibir la proliferación de los promastigotes de forma dosis-dependiente con un valor de IC₅₀ de 8,93 μM. Alteraciones en la morfología del promastigote en presencia de la droga también fueron observadas. Por otra parte, este compuesto también disminuyó del porcentaje de infección a macrófagos múridos por amastigotes (IC₅₀ de 2,19μM).

La quinolina FR25 también fue evaluada en combinación con la miltefosina, demostrando un efecto sinérgico entre ambos compuestos en los dos morfotipos del parásito. Cabe destacar la importancia de este resultados, puesto que la terapia combinatoria se postula como una opción para retrasar el desarrollo de resistencia, disminuir las dosis y el tiempo de tratamiento, y aumentar la actividad antiparasitaria de los compuestos asociados (Villa, 2014).

Tomando en cuenta la respuesta diferencial de las distintas especies de *Leishmania* hacia una misma droga y conociendo la efectividad que tienen las quinolinas y sus derivados contra el parásito, decidimos evaluar el efecto del compuesto 7-cloroquinolina-4-oxifenil (2-metoxi-5-carboxialdehído) o FR25 sobre *Leishmania braziliensis* y *Leishmania donovani*, para así obtener un panorama completo del efecto de esta quinolina sobre especies representativas de las principales formas clínicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de la 7-cloroquinolina-4-oxifenil (2-metoxi-5-carboxialdehido) sobre *Leishmania donovani* y *Leishmania braziliensis*

2.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto de una 7-cloroquinolina -4-oxifenil (2-metoxi-5-carboxialdehido) sobre:

- La viabilidad de promastigotes de *Leishmania donovani* y *Leishmania braziliensis*
- El porcentaje de infección de macrófagos múridos de la línea celular J774 por amastigotes de *Leishmania donovani* y *Leishmania braziliensis*

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Cultivo Celulares

3.1.1 Cultivo de promastigotes

Se utilizaron dos cepas de referencia de dos especies de *Leishmania*: *L. (V) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) y *L. (L) donovani* (MHOM/IN/80/DD8) suministrados por el Laboratorio de Biología Celular de Parásitos del Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, U.C.V. Los cultivos se mantuvieron *in vitro* en értulas estériles de 125 ml de capacidad y en frascos de cultivo celular T25 a temperatura ambiente y sin agitación, cultivados en medio Schneider (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Paisley, UK) inactivado a 56 °C y 1% de Penicilina/Estreptomicina. El número de parásitos se determinó por el conteo directo de células, utilizando la cámara de Neubauer. Alternativamente se realizó una medida indirecta basada en la relación preestablecida entre la turbidez del cultivo, el porcentaje de transmitancia y el número de células/ml en un fotocolorímetro Spectronic 20 para aquellos cultivos que se encontraban en értulas.

3.1.2 Cultivo de macrófagos

Los macrófagos que empleados pertenecen a la línea celular J774, se cultivaron en frascos de cultivo celular T25 en medio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado con 10% de SFB, 1% de Penicilina/Estreptomicina, incubados en una cámara de crecimiento con atmósfera de CO₂ al 5% y a una temperatura de 37 °C.

3.2 Compuestos a evaluar

Las quinolina FR25 o 7-cloroquinolina-4-oxifenil (2-metoxi-5-carboxialdehído), de fórmula empírica $C_{17}H_{12}ClNO_3$ es un compuesto semisintético derivado de diversas modificaciones de cicloadición del eugenol que fue extraído del aceite esencial de *Eugenia caryophyllus*. Fue sintetizado en el laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular de la Universidad Industrial de Santander de Colombia y fue facilitado por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología de Experimental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

Se prepararon soluciones del compuesto en el rango milimolar (mM) utilizando como disolvente dimetil-sulfoxido (DMSO). A partir de estas se tomaron alícuotas para obtener las concentraciones de interés a ser evaluadas tanto en promastigotes como en amastigotes de *Leishmania donovani* y *Leishmania braziliensis*.

3.3 Ensayo de citotoxicidad del compuesto FR25 sobre promastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis*

La citotoxicidad del compuesto FR25 sobre los promastigotes se evaluó empleando la reducción del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazo) (Mossman, 1983; Valdivieso y col. 2010).

Los promastigotes fueron cultivados en medio Schneider (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado con 10% de SFB y 1% de Penicilina/Estreptomina, hasta llegar a fase exponencial. Una vez estén esta fase, se tomó una alícuota del cultivo y se centrifugó a 2000g durante 2 minutos, posteriormente los parásitos fueron resuspendidos en medio RPMI sin rojo fenol suplementado con 10% de suero fetal bovino 1% de

Penicilina/Estreptomina y 2mM de L-glutamina. Alícuotas de esta suspensión fueron colocadas en placas de 96 pozos con una concentración final de 500.000 células/ pozo e incubadas durante 48 horas con diferentes concentraciones del compuesto FR25, también disuelto el medio RPMI sin rojo fenol. Cuando finalizó el tiempo de incubación se agregó 10µL de MTT en cada pozo, con una concentración final de 5mg/mL y se incubó durante al menos 2 horas. Finalizado este tiempo se añadió 100µL de DMSO a cada pozo y se midió la absorbancia a 570nm en un lector ELISA (TECAN-Spectralfluor). La intensidad del color fue proporcional al número de promastigotes viables. La droga anfotericina B (AmB) fue empleada como control positivo del experimento.

Los resultados fueron graficados utilizando el programa Sigmaplot 12.0 y para el cálculo del IC₅₀ se utilizó la función “Four Parameter Logistic Curve”.

3.4 Efecto del compuesto FR25 sobre el porcentaje de infección de amastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis* a macrófagos móridos de la línea celular J774

Los macrófagos de la línea celular J774 fueron cultivados a 37°C y atmósfera 5% CO₂, en laminillas estériles contenidas en placas de cultivo de seis pozos, colocando 150.000 macrófagos por laminilla, en 1 mL de medio RMPI suplementado con 5% de SFB y 1% penicilina-estreptomina. Transcurridas 24 horas se agregó los promastigotes de *L. donovani* o *L. braziliensis* según sea el caso, en una proporción de diez promastigotes por cada macrófago y se incubaron durante 24 horas a 37°C y atmósfera 5% CO₂.

Finalizado el tiempo de infección se realizaron lavados rápidos con medio RPMI de manera de eliminar los parásitos que no lograron infectar a los macrófagos. Los macrófagos ya infectados con amastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis* fueron tratados con

diferentes concentraciones del compuesto FR25 e incubados durante 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación con la droga, se removió el medio de los pozos y se fijaron a las laminillas empleando metanol absoluto por 20 minutos, posteriormente se tiñeron con el colorante Giemsa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 20 minutos, finalmente, se retiró el exceso de colorante con agua. El conteo de los macrófagos infectados y no infectados permitió determinar el porcentaje de infección y el número de amastigotes intracelulares por cada 100 macrófagos, esto se realizó empleando el objetivo de inmersión (100X) de un microscopio óptico. La droga anfotericina B (AmB) fue empleada como control del experimento.

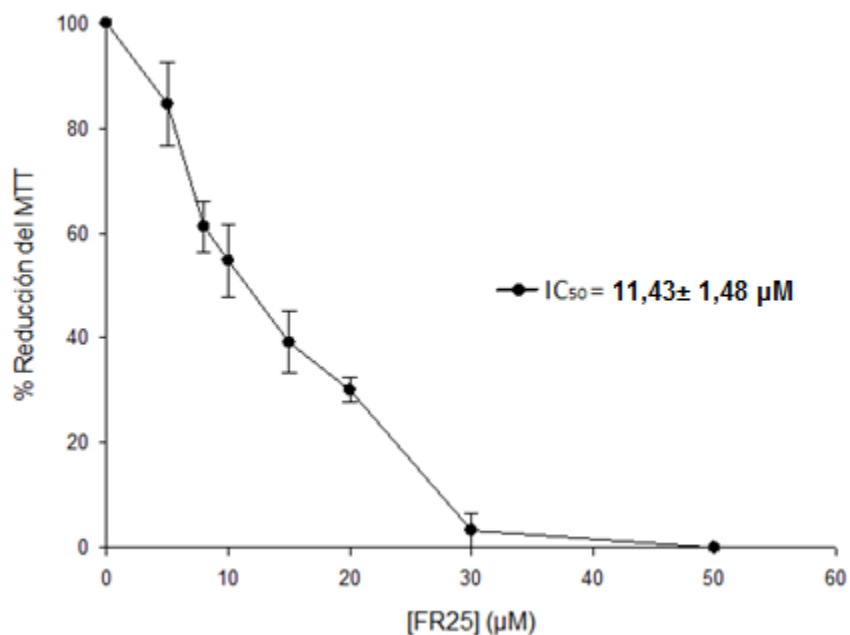
Los resultados fueron graficados utilizando el programa Sigmaplot 12.0 y para el cálculo del IC_{50} se utilizó la función “Four Parameter Logistic Curve”.

4. RESULTADOS

4.1 Efecto del compuesto FR25 sobre la viabilidad de promastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis*

Se evaluó *in vitro* la viabilidad de los promastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis* ante distintas concentraciones del compuesto FR25 mediante la reducción del reactivo MTT a las 48 horas. En presencia de la droga se observa una disminución de manera dosis dependiente de la viabilidad celular de los promastigotes en ambas especies. El del valor IC_{50} estimado fue de $11,43 \mu\text{M}$ en el caso de *L. donovani* (Figura 1A) y de $60,08 \mu\text{M}$ para *L. braziliensis* (Figura 1B)

A



B

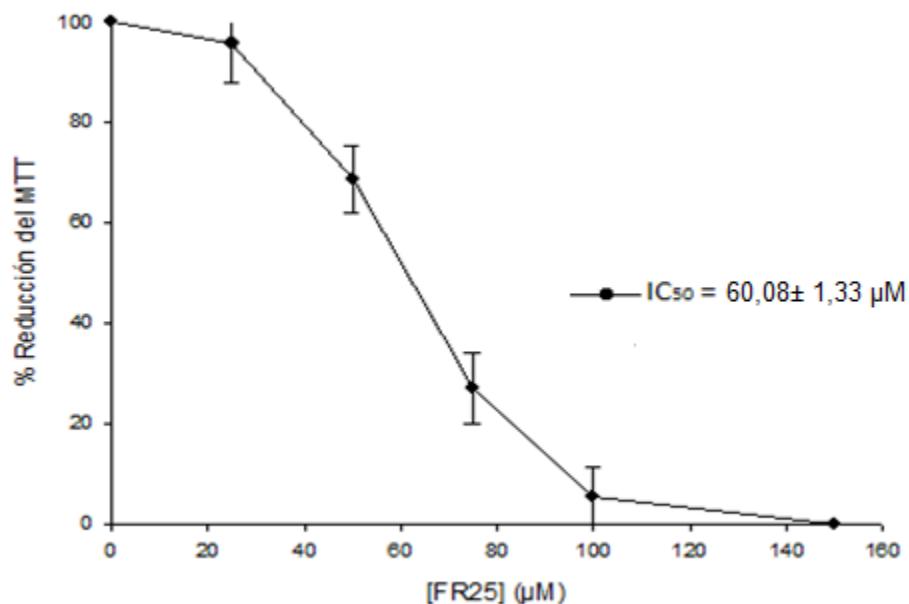
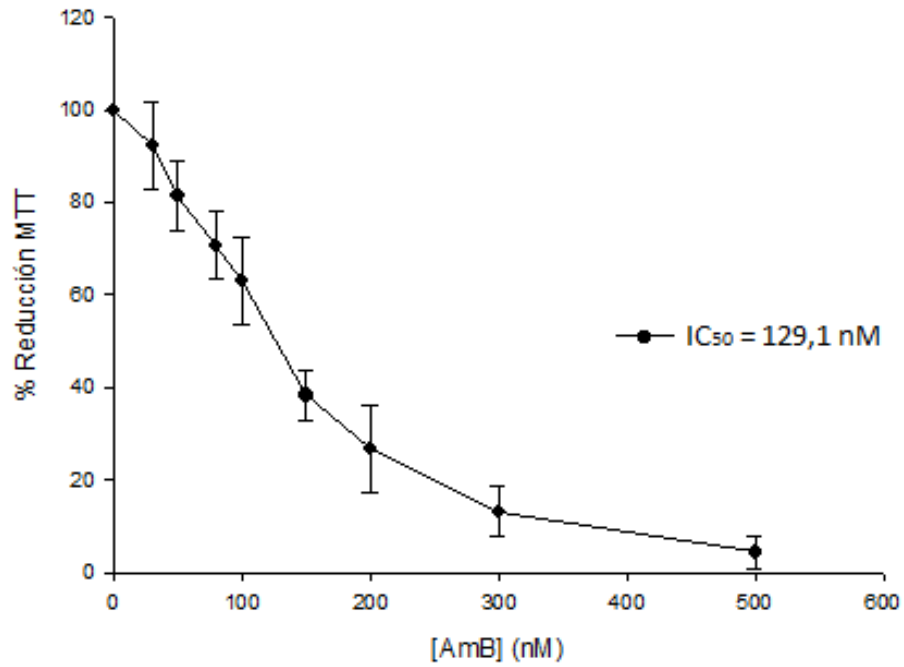


Figura 1: Efecto del compuesto FR25 sobre la viabilidad de (A) *Leishmania donovani* (B) *Leishmania braziliensis*. Los datos son el resultado de tres experimentos independientes.

4.2 Efecto del compuesto Anfotericina B (AmB) sobre la viabilidad de promastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis*

La viabilidad de los promastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis* ante la Anfotericina B (droga control en este estudio) fue evaluada *in vitro* mediante la reducción del reactivo MTT a las 48 horas. Los parásitos fueron incubados con diferentes concentraciones de la droga. En presencia de la droga, se observa la disminución de la viabilidad celular de los promastigotes en ambas especies de manera dosis dependiente, con un valor IC₅₀ estimado 129,1nM en el caso de *L. donovani* y 101,99 nM (Figura 2A) en el caso de *Leishmania braziliensis* (Figura 2B)

A



B

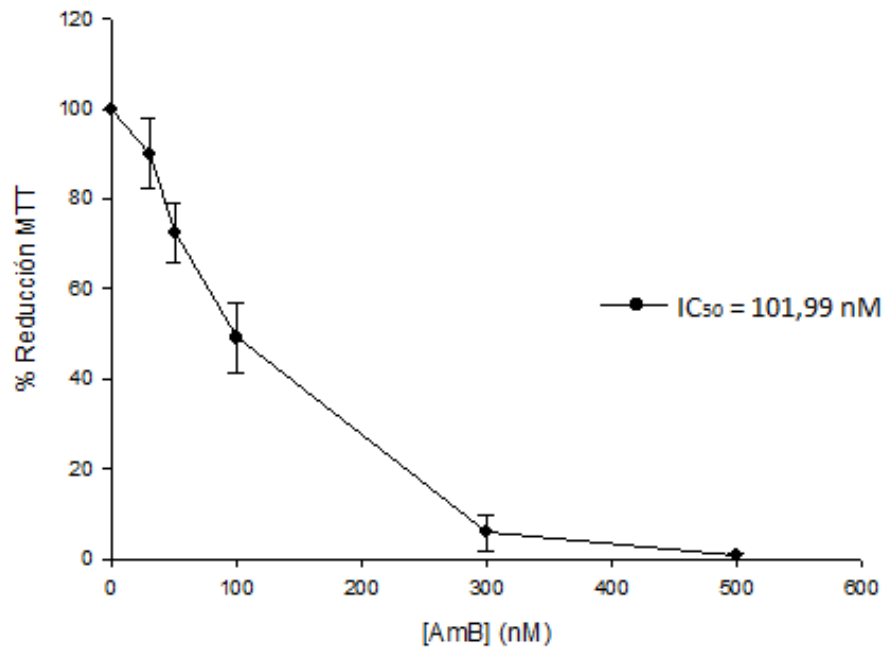


Figura 2: Efecto de anfotericina B (AmB) sobre la viabilidad de (A) *Leishmania donovani* (B) *Leishmania braziliensis*. Los datos son el resultado de tres experimentos independientes.

4.3 Efecto del compuesto FR25 sobre el porcentaje de infección por amastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis* a macrófagos móridos de la línea celular J774

Se evaluó el efecto del compuesto FR25 sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania donovani* y *Leishmania braziliensis*. En el caso de *L. donovani*, el compuesto fue capaz de disminuir el porcentaje de infección de macrófagos móridos de la línea celular J774 de manera dosis dependiente con un valor IC₅₀ estimado de 1,59µM (Tabla 3, fig. 3A). Además se observó una disminución importante del número de amastigotes por célula, llegando a observarse vacuolas vacías a altas concentraciones de la droga (Tabla 3, fig. 4).

En el caso de amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, a concentraciones tan altas como 28 µM, las cuales ya afectan a la célula hospedera, el compuesto no fue competente en reducir el porcentaje de infección ni siquiera en un 50% (Tabla 4, fig. 3B).

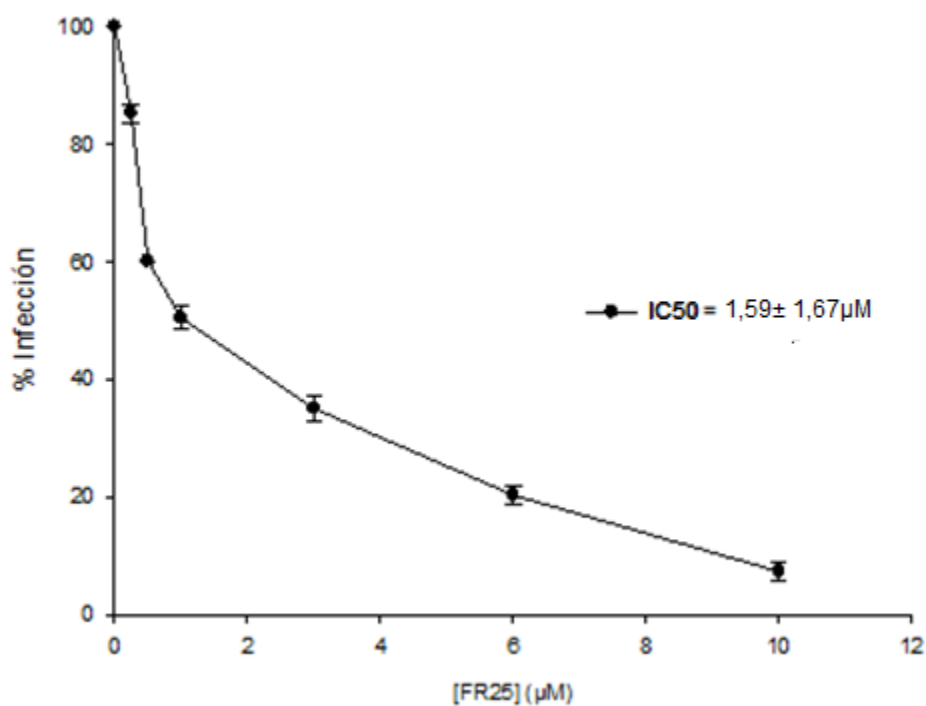
Tabla 3: Efecto del compuesto FR25 sobre el porcentaje de infección por amastigotes de *L. donovani* a macrófagos móridos de la línea celular J774. Los datos fueron normalizados tomando como 100% el porcentaje de infección obtenido para las células sin tratamiento en cada réplica. El porcentaje infección para las células sin tratamiento fue de 58,48% ± 9,48%

Concentración FR25 (µM)	% Infección	% Inhibición de la infección	N° amastigotes/cél.
0	100	0	4 ± 1,4
0,25	85,30 ± 1,58	14,70	3 ± 0,7
0,5	61,17 ± 1,39	38,83	2 ± 0,7
1	50,54 ± 2,05	49,46	1
3	35,16 ± 2,01	64,84	1
6	20,41 ± 1,75	79,59	1
10	7,44 ± 1,65	92,56	1

Tabla 4: Efecto del compuesto FR25 sobre el porcentaje de infección por amastigotes de *L. braziliensis* a macrófagos múridos de la línea celular J774. Los datos fueron normalizados tomando como 100% el porcentaje de infección obtenido para las células sin tratamiento en cada réplica. El porcentaje de infección para las células sin tratamiento fue de $57,87\% \pm 5,90\%$

Concentración FR25 (μM)	% Infección	% Inhibición de la infección	N° amastigotes/cél.
0	100,00	0	$5 \pm 0,7$
10	$82,57 \pm 2,16$	17,43	$5 \pm 0,7$
13	$79,11 \pm 2,39$	20,89	$4 \pm 0,7$
17	$76,62 \pm 1,75$	23,38	$4 \pm 0,7$
21	$74,50 \pm 1,93$	25,50	$3 \pm 1,4$
24	$65,79 \pm 0,37$	34,21	$3 \pm 0,7$
28	$61,64 \pm 1,44$	38,64	$1 \pm 0,7$

A



B

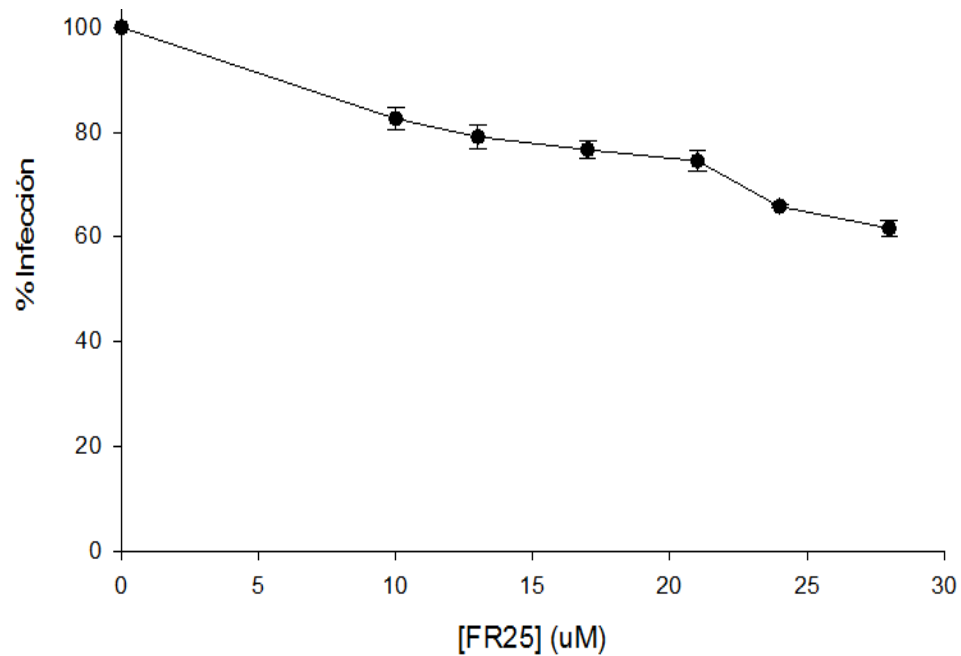


Figura 3: Efecto del compuesto FR25 sobre el porcentaje de infección por amastigotes de (A) *L. donovani* y (B) *L. braziliensis* a macrófagos móridos de la línea celular J774. Los datos son el resultado de dos experimentos independientes.

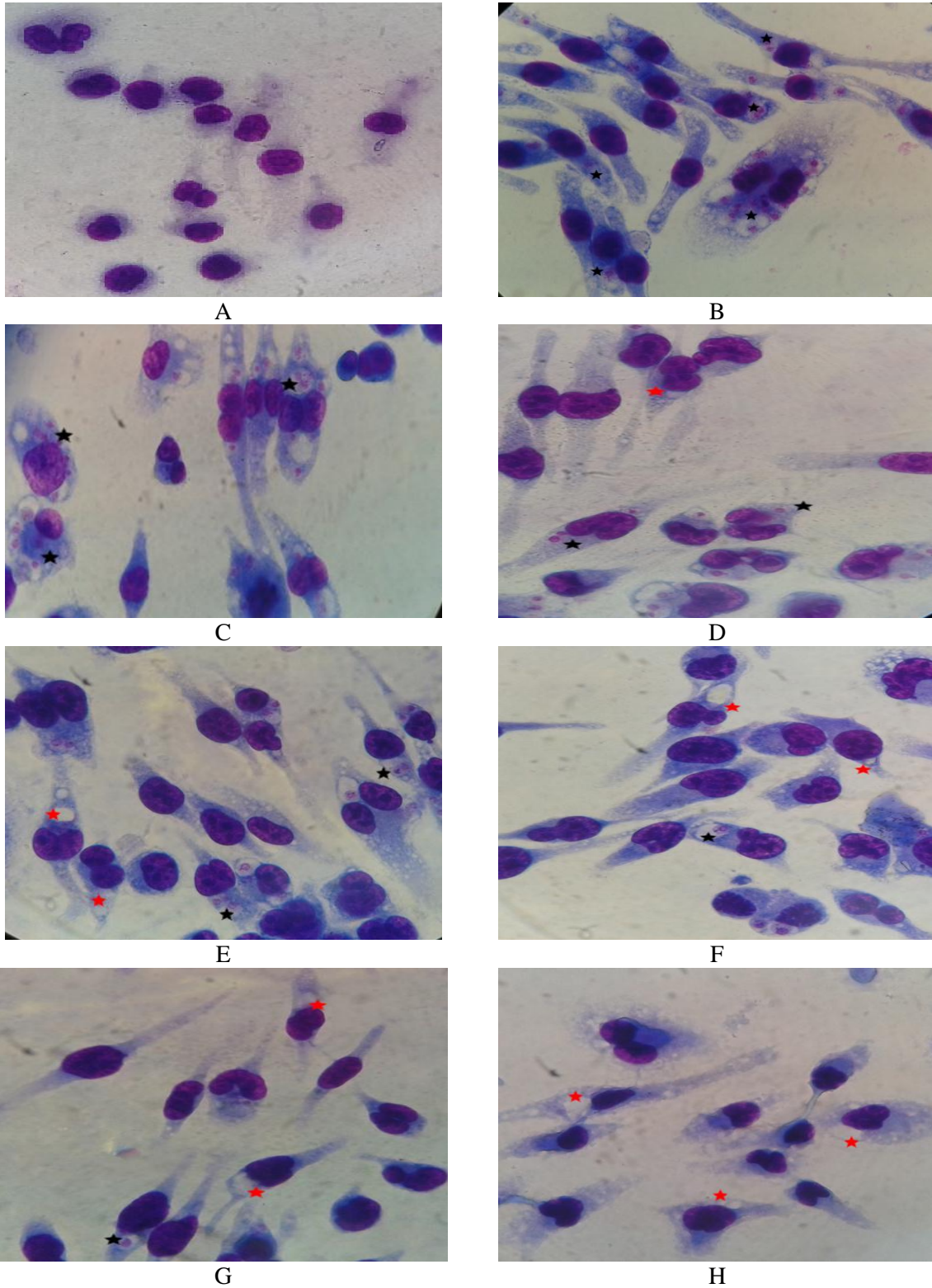


Figura 4: Efecto de FR25 sobre el porcentaje de infección de amastigotes de *L. donovani*. (A) Control sin infectar; (B) Control infectado; (C) 0,25 μ M FR25; (D) 0,5 μ M FR25; (E) 1 μ M FR25; (F) 3 μ M FR25; (G) 6 μ M FR25; (H) 10 μ M FR25. Las estrellas negras indican presencia de amastigotes y las estrellas rojas indican vacuolas vacías. (Aumento: 1000X)

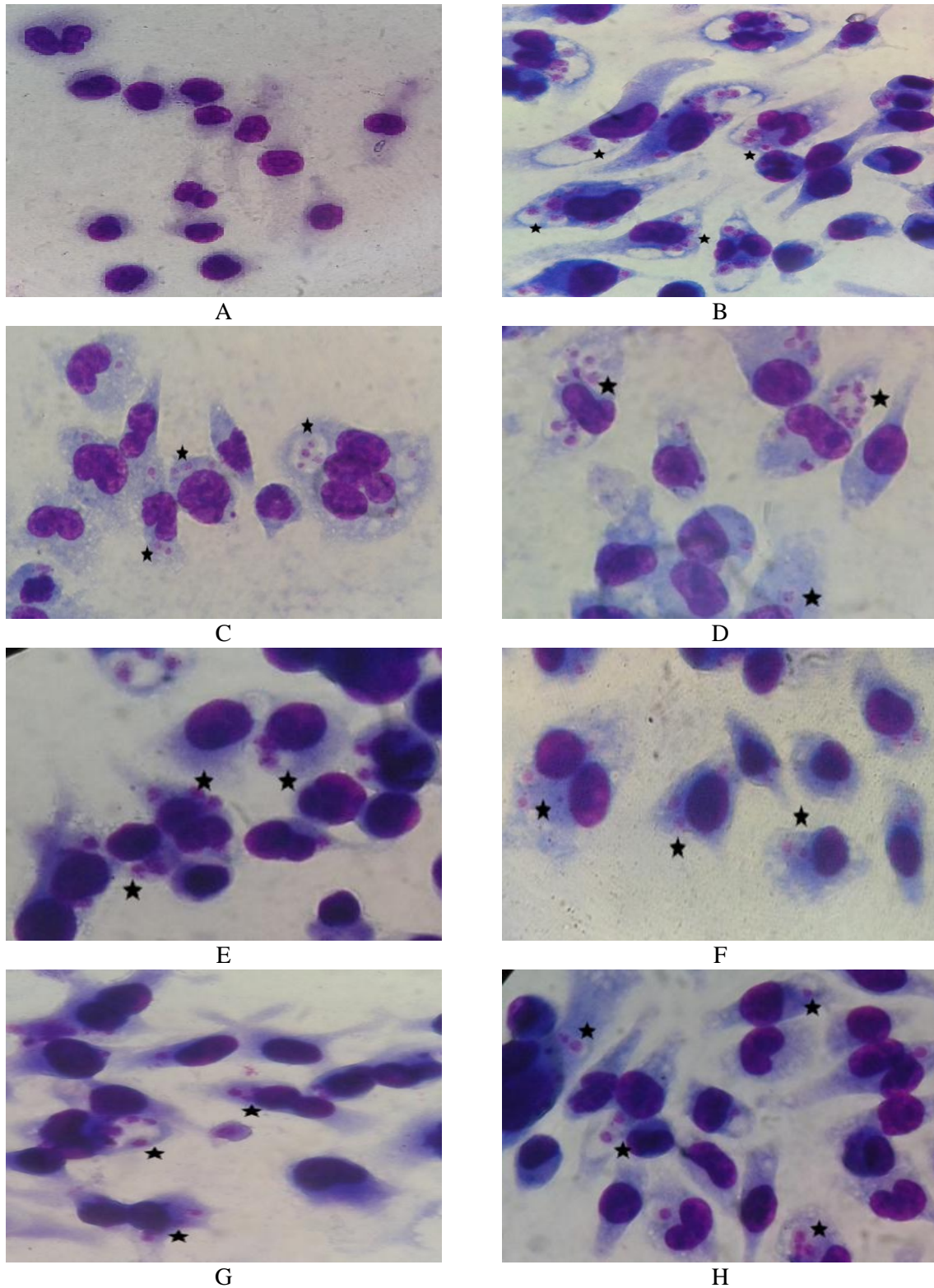
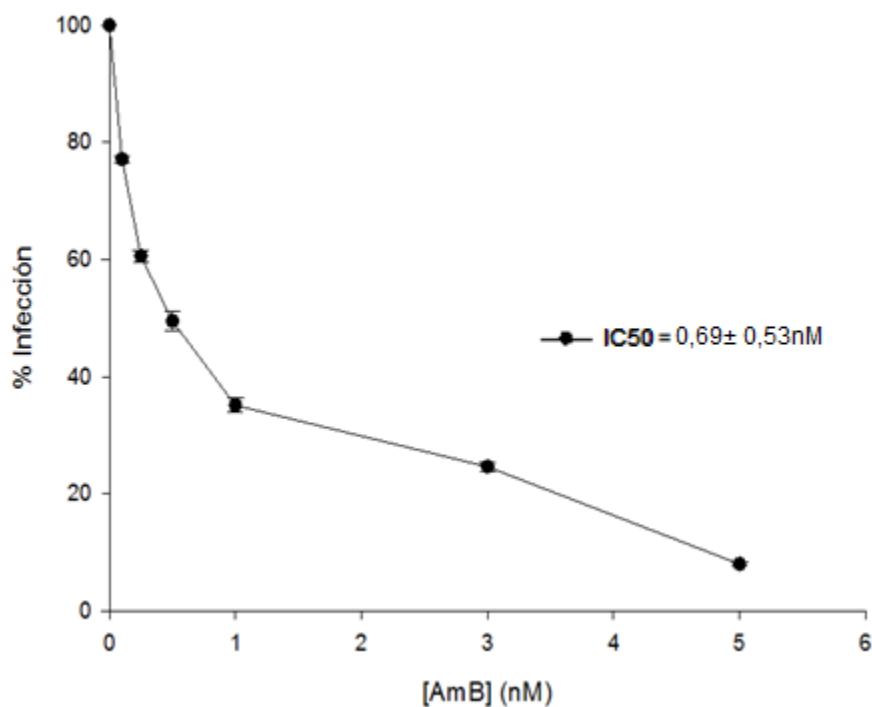


Figura 5: Efecto de FR25 sobre el porcentaje de infección de amastigotes de *L. braziliensis*. (A) Control sin infectar; (B) Control infectado; (C) 10 μ M FR25; (D) 13 μ M FR25; (E) 17 μ M FR25; (F) 21 μ M FR25; (G) 24 μ M FR25; (H) 28 μ M FR25. Las estrellas negras indican presencia de amastigotes. (Aumento: 1000X)

4.4 Efecto de Anfotericina B (AmB) sobre el porcentaje de infección por amastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis* a macrófagos mórídos de la línea celular J774

Se evaluó el efecto de la Anfotericina B (droga control en este estudio) sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania donovani* y *Leishmania braziliensis*. Los parásitos fueron incubados con diferentes concentraciones de la droga. El compuesto fue capaz de disminuir el porcentaje de infección de macrófagos mórídos de la línea celular J774 de manera dosis dependiente en ambos casos, con un valor IC_{50} estimado de 0.69 nM en el caso de *Leishmania donovani* (Figura 6A) y 0.63nM para *Leishmania braziliensis* (Figura 6B)

A



B

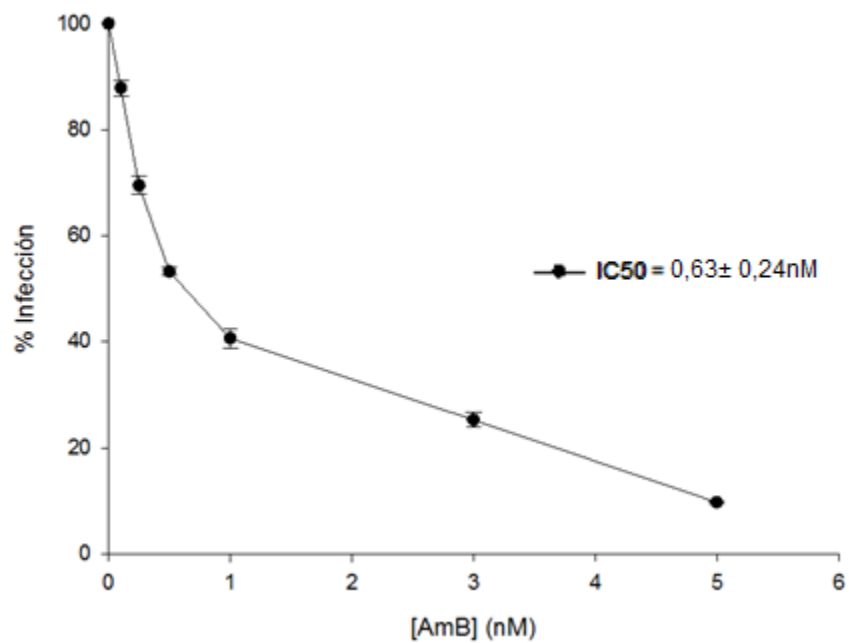


Figura 6: Efecto de la Anfotericina B (AmB) sobre el porcentaje de infección por amastigotes de (A) *L. donovani* y (B) *L. braziliensis* a macrófagos múridos de la línea celular J774. Los datos son el resultado de dos experimentos independientes.

5. DISCUSIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades tropicales desatendidas son aquellas afecciones que proliferan en entornos empobrecidos, siendo en su mayoría enfermedades parasitarias. De las clásicas enfermedades olvidadas, la Leishmaniasis tiene un gran impacto, tanto en la magnitud de su morbilidad y mortalidad, como en su amplia distribución geográfica (Alvar y col., 2006). Las drogas usadas para el tratamiento de esta enfermedad presentan diversos problemas, entre los que se encuentra una alta toxicidad, diversos efectos secundarios, y desarrollo de resistencia por parte del parásito (Mozonte, 2009). Una de las estrategias para combatir esta problemática ha sido la búsqueda de nuevos compuestos que sean eficientes contra el parásito, con menores efectos secundarios, y efectivas a bajas dosis (de Mello y col., 2014).

El estudio de plantas medicinales utilizadas en la preparación de remedios populares ha proporcionado a la medicina moderna productos farmacéuticos eficaces para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos protozoarios. Flavonoides, chalconas, terpenos, lignanos, quinolinas, etc., han sido reportados como derivados de plantas altamente eficientes en disminuir la proliferación de distintas especies de *Leishmania* y *Trypanosoma* (Polonio y Efferth, 2008).

Dentro de este grupo de derivados, las quinolinas han sido de gran importancia pues además de su actividad antiparasitaria, se han reportado como antitumorales, antibacteriales, antifúngicos, insecticidas, anti-inflamatorios, entre otras actividades, haciendo que estos derivados tengan diversas aplicaciones en la medicina y la agricultura (Shang, y col. 2017). Como leishmanicida, han destacado diversas de estas moléculas como

la sitamaquina, uno de los derivados quinolínicos más importantes en fase de prueba para el tratamiento de la leishmaniasis visceral (Antinarelli y col., 2016), las indolquinolinas (Sharma y col., 2014), hidroxiquinolinas, (Costa y col., 2016), etc.

En este sentido, dado la amplia evidencia de la actividad antileishmania de distintos derivados quinolínicos, y dado al efecto antiproliferativo evaluado en nuestro laboratorio que demostró tener la 7-cloroquinolina-4-oxifenil(2-metoxi-5-carboxialdehído) o FR25 sobre *Leishmania mexicana* (Torrealba, 2015) decidimos estudiar el efecto de esta misma quinolina sobre *Leishmania donovani* y *Leishmania braziliensis* de manera de tener una visión más completa sobre su actividad antiparasitaria en distintas especies, las cuales son representativas de cada una de las formas clínicas descritas.

Como puede observarse en la figura 1, hay una disminución de la viabilidad de los promastigotes de ambas especies, de forma dosis-dependiente cuando los parásitos fueron tratados con la quinolina FR25. Un efecto similar fue reportado por Torrealba (2015) al tratar a promastigotes de *Leishmania mexicana* con esta misma droga ($IC_{50}=8,93\mu M$).

Al comparar los valores de IC_{50} para la droga evaluada entre las especies *L. donovani* ($IC_{50}=11,43\mu M$), *L. braziliensis* ($IC_{50}=60,08\mu M$), y *L. mexicana* ($IC_{50}=8,93\mu M$), se observa diferentes sensibilidades, siendo *L. braziliensis* entre cinco y seis veces menos sensible al FR25.

Antinarelli y col. (2016) evaluaron otros miembros de esta familia de compuestos, las 7-cloro-4-quinolinhidrazonas, quienes también presentaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de promastigotes de *L. amazonensis*, obteniendo un valor IC_{50} de $21,1\mu M$ para el derivado más destacado. Estos investigadores además encontraron que al tratar los

promastigotes con la quinolina mencionada, incrementaba la producción de especies reactivas de oxígeno y se despolarizaba la mitocondria sin la ruptura de la membrana plasmática

Una vez demostrado un efecto antiproliferativo del compuesto FR25 sobre los promastigotes de las especies mencionadas, se procedió estudiar la acción del mismo sobre amastigotes intracelulares. Pudo observarse que el compuesto tuvo un efecto inhibitorio del porcentaje de infección de manera dosis dependiente en el caso de infección por *L. donovani*, como se muestra en la tabla 3 y en la figura 3A. Se observó además que los amastigotes fueron más sensibles a la droga que los promastigotes con valores de IC_{50} a las 48 horas de 1,59 μM en el caso de los amastigotes y 11,43 μM en promastigotes. Esta mayor sensibilidad por parte del amastigotes al FR25 también fue reportada en el caso de *L. mexicana* (Torrealba, 2015). Se ha reportado previamente una mayor sensibilidad del amastigote, en comparación al promastigote hacia una misma droga, como por ejemplo en el caso de la anfotericina B (Vermeersh y col. 2009) y también en algunos derivados quinolónicos (Coimbra y col. 2016). Las diferencias morfológicas así como bioquímicas entre estos dos morfotipos, pueden explicar esta susceptibilidad diferencial que se presenta hacia un mismo compuesto.

En el caso de la infección por *L. braziliensis*, contrario a lo que observamos en el caso de *L. donovani*, el compuesto FR25 no fue capaz de disminuir el porcentaje de infección a macrófagos de manera dosis-dependiente. A una concentración de 28 μM , la máxima concentración evaluada en este caso, sólo se obtuvo una inhibición de la infección del 38,64% (Tabla 4). Mayores concentraciones del compuesto FR25 no fueron

evaluadas ya que altas concentraciones del mismo se reportan por Torrealba (2015) como citotóxicas para macrófagos ($IC_{50} = 28 \pm 2,86 \mu M$)

Se ha denominado a *Leishmania braziliensis* como una de las especies más agresivas y prevalentes en el Nuevo Mundo (Jara y col., 2017), además de ser considerada la más resistente a diversos tratamientos (Correia y col., 2016). Rangel y col. (1996) demostraron que promastigotes de *L. braziliensis* era menos sensibles a la actividad del ketoconazol que los promastigotes de *L. mexicana*. Concentraciones entre 0,03 a 0,06 μM de ketoconazol inhiben casi completamente el crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana*, mientras que a 10 μM este azol produjo sólo una moderada disminución de la proliferación de los promastigotes de *L. braziliensis*. Esto ocurre porque en el caso de *L. braziliensis*, los esteroides que se acumulan por inhibición de la enzima C14 α -demetilasa en presencia de la droga, pueden desempeñar las funciones metabólicas de los esteroides normales, fenómeno que no ocurrió en el caso de *L. mexicana*. Por otra parte, Sánchez-Cañete y col. (2009) obtienen que promastigotes de *L. donovani* son de 6 a 10 veces más sensibles a la actividad de la miltefosina que los promastigotes de seis distintas cepas de *L. braziliensis*. Estos autores objetan que la maquinaria necesaria para la translocación de la miltefosina en la membrana plasmática de *L. braziliensis* está reducida en comparación con la que está presente en la membrana de *L. donovani*, en consecuencia, la tasa de internalización de la miltefosina en *L. donovani* es de 75% mientras que en las distintas cepas de *L. braziliensis*, fue menor al 20%.

Peacock y col. (2007) clasifican a *Leishmania braziliensis* como una especie fuera de lo común, basándose en las similitudes de las secuencias y en el arreglo cromosomal, pues *L. braziliensis* posee 35 cromosomas en comparación a *L. major* y *L. infantum*,

quienes poseen 36. Otra característica resaltante de esta especie que arroja este estudio, es que un grupo de genes que codifica para la metaloproteína GP63 parecen estar repetidos cuatro veces más en *L. braziliensis* en comparación con *L. major* o *L. infantum*. Estas variaciones bioquímicas y moleculares podrían ser algunas de las características responsables que expliquen las diferencias en la sensibilidad intrínseca de las distintas especies de *Leishmania*, especialmente de *L. braziliensis*.

Otros derivados quinolínicos han sido evaluados sobre *L. braziliensis*, y se ha observado, que para ciertos derivados, esta especie tiene una menor sensibilidad en comparación con otras, por ejemplo, Combria y col. (2016) reportan que la 4-(3-cloropropiltiol)-7-cloroquinolina tiene actividad antiproliferativa en promastigotes de *L. amazonensis*, con un IC_{50} de $27,9\mu M$ pero al evaluar esta misma quinolina sobre promastigotes de *L. braziliensis* su IC_{50} superaba los $100\mu M$.

A pesar de la poca sensibilidad que presenta la especie *L. braziliensis* ante ciertos derivados quinolínicos como el aquí evaluado, existen algunas modificaciones de la estructura de esta molécula que tienen un marcado efecto antiproliferativo sobre esta especie. En el caso de Bompert y col. (2013) se reporta que la quinolina 6-etil-2-fenilquinolina era capaz de inhibir el crecimiento de promastigotes ($ED_{50}=6\mu M$) y amastigotes ($ED_{50}=20\mu M$) de *L. braziliensis*, además observaron alteraciones en la bioenergética del parásito, ya que al tratar a los promastigotes con dicha quinolina, se observó que se disipaba el gradiente mitocondrial de protones, además también se observó alteraciones en rutas biosintéticas del esterol, específicamente una acumulación del escualeno (un intermediario en la ruta de los ergosteroles) y una disminución de 5-dehidroepisterol (uno producto final en la ruta de los esteroles).

De los resultados obtenidos en este trabajo, así como de otros aquí referidos, podemos concluir que la sensibilidad hacia una misma droga varía dependiendo de especie de *Leishmania* debido a las características intrínsecas que definen a cada una de ellas, siendo *L. braziliensis* una de las especies menos sensible a diversas drogas. Sin embargo, cabe destacar que aunque algunos derivados quinolínicos no tienen un efecto antiproliferativo sobre *L. braziliensis*, lo tienen sobre otras especies de importancia clínica como *L. donovani*. Además, existen otros estudios en los que se evalúan distintos derivados de esta molécula cuya actividad tiene un efecto leishmanicida para *L. braziliensis*, en este sentido, modificaciones en la estructura de la quinolina empleada en este estudio, podrían derivar en el efecto antiproliferativo deseado en esta y otras especies.

6. CONCLUSIONES

- La quinolina FR25 tuvo un efecto inhibitorio dosis-dependiente en cultivos de promastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis*. Sin embargo, para observar este efecto en *L. braziliensis* se emplearon concentraciones cinco veces por encima de las efectivas para *L. donovani*.
- La quinolina FR25 disminuyó significativamente el porcentaje de infección a macrófagos por amastigotes de *L. donovani*. Sin embargo no se observó el mismo efecto en el caso de infección por amastigotes de *L. braziliensis*. Mayores concentraciones no pudieron ser evaluadas en esta especie a causa de la citotoxicidad de la quinolina a macrófagos

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvar, J., Yactayo, S., & Bern, C. (2006). Leishmaniasis and poverty. *Trends in parasitology*, **22**(12), 552-557.
2. Antinarelli, L. M. R., de Oliveira Souza, I., Glanzmann, N., das Chagas Almeida, A., Porcino, G. N., Vasconcelos, E. G., & Coimbra, E. S. (2016). Aminoquinoline compounds: Effect of 7-chloro-4-quinolinyhydrazone derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, **171**, 10-16.
3. Botero, D. (1998) Parasitosis humanas. CORPORACION PARA INVESTIGACIONES BIOLOGICAS. Tercera edición.
4. Bompart, D., Núñez-Durán, J., Rodríguez, D., Kouznetsov, V. V., Gómez, C. M. M., Sojo, F., García-Marchán, Y. (2013). Anti-leishmanial evaluation of C2-aryl quinolines: Mechanistic insight on bioenergetics and sterol biosynthetic pathway of *Leishmania braziliensis*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **21**(14), 4426-4431.
5. Coimbra, E. S., Antinarelli, L. M., Silva, N. P., Souza, I. O., Meinel, R. S., Rocha, M. N. & da Silva, A. D. (2016). Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. *Chemico-biological interactions*, **260**, 50-57.
6. Correia, V. C. D. S., Lima, N. O., Oliveira, F. A. D. S., Santos, A. P. D. A. D., Teles, C. B. G., & Oliveira Júnior, W. P. D. (2016). Evaluation of the antiplasmodial and leishmanicidal potential of Myrciariadubia (Myrtaceae) extract. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **49**(5), 586-592..

7. De Mello, T. F., Bitencourt, H. R., Pedroso, R. B., Aristides, S. M., Lonardoní, M. V., & Silveira, T. G. (2014). Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Experimental parasitology*, **136**, 27-34.
8. De Menezes, J. B., da Silva, T. A., Grillo, L. A., & Dornelas, C. B. (2015). Therapeutic Arsenal against Leishmaniasis: A Review.
9. Dueñas-Romero, A. M., Loiseau, P. M., Saint-Pierre-Chazalet, M. (2007). Interaction of sitamaquine with membrane lipids of *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1768**(2), 246-252.
10. Escobar, P., Matu, S., Marques, C., Croft, S. L. (2002). Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Tropica*, **81**(2), 151-157.
11. Fournet, A., Barrios, A. A., Muñoz, V., Hocquemiller, R., Cavé, A., Bruneton, J. (1993). 2-substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **37**(4), 859-863.
12. Jara, M., Berg, M., Caljon, G., De Muylder, G., Cuypers, B., Castillo, D. & Arevalo, J. (2017). Macromolecular biosynthetic parameters and metabolic profile in different life stages of *Leishmania braziliensis*: Amastigotes as a functionally less active stage. *PloSone*, **12**(7).
13. Jhingran, A., Chawla, B., Saxena, S., Barrett, M. P., Madhubala, R. (2009). Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and biochemical parasitology*, **164**(2), 111-117.
14. Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in parasitology*, **22**(9), 439-445.

15. Kouznetsov, V. (1999). Espiro-2 (1H) quinolinas: síntesis y propiedades. *REVISTA de la SOCIEDAD*, **43**(1), 30-35.
16. Lackovic, K., Parisot, J. P., Sleebs, N., Baell, J. B., Debien, L., Watson, K. G., Kedzierski, L. (2010). Inhibitors of *Leishmania* GDP-mannose pyrophosphorylase identified by high-throughput screening of small-molecule chemical library. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **54**(5), 1712-1719.
17. Loiseau, P. M., Cojean, S., Schrével, J. J. (2011) Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance. *Parasite***18**(2), 115–119
18. Monzote, L. (2009). Current treatment of leishmaniasis: a review. *The Open Antimicrobial Agents Journal*, **1**(1).
19. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, **65**(1), 55-63
20. Nieves, M. P., Díaz, E., Romero, A., Machuca, C., Sucre, A. P. (2007). Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimio-resistencia en *Leishmania*. *Vitae: Academia Biomédica Digital*, (33), 1.
21. Ouellette, M., Drummelsmith, J., Papadopoulou, B. (2004). Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*, **7**(4), 257-266.
22. Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C., Bréard, J. (2004). Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **48**(3), 852-859.

23. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA. (2007) Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet.* **39**: 839–847.
24. Polonio, T., Efferth, T. (2008). Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). *International Journal of Molecular Medicine*, **22**(3), 277.
25. Ramos, H., Valdivieso, E., Gamargo, M., Dagger, F., Cohen, B. E. (1996). Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *The Journal of membrane biology*, **152**(1), 65-75.
26. Rangel, H., Dagger, F., Hernandez, A., Liendo, A., & Urbina, J. A. (1996). Naturally azole-resistant *Leishmania braziliensis* promastigotes are rendered susceptible in the presence of terbinafine: comparative study with azole-susceptible *Leishmania mexicana* promastigotes. *Antimicrobialagents and chemotherapy*, **40**(12), 2785-2791.
27. Rocha, L. G., Almeida, J. R. G. S., Macedo, R. O., Barbosa-Filho, J. M. (2005). A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, **12**(6), 514-535.
28. Salazar, M., Castro, E. (2001). Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y cutánea difusa. Revisión clínica de los casos en el Hospital Regional de Pucallpa de 1997 a 1999. *Dermatol. peru*, **11**(1), 21-25.
29. Sánchez-Cañete, M. P., Carvalho, L., Pérez-Victoria, F. J., Gamarro, F., & Castanys, S. (2009). Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrobialagents and chemotherapy*, **53**(4), 1305-1313.
30. Sharma U., Singh S (2008). “Insect vectors of *Leishmania*: Distribution, physiology and their control”. Review Articles. *J Vector Borne, Dis*, **45**: 255-272

- 31.** Sharma, R., Pandey, A. K., Shivahare, R., Srivastava, K., Gupta, S., & Chauhan, P. M. (2014). Triazinoindole–quinoline hybrid: A novel approach to antileishmanial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **24**(1), 298-301.
- 32.** Shang, X. F., Morris-Natschke, S. L., Liu, Y. Q., Guo, X., Xu, X. S., Goto, M. & Lee, K. H. (2017). Biologically active quinoline and quinazoline alkaloids part I. *Medicinal Research Reviews*.
- 33.** Singh, N., Kumar, M., Singh, R. K. (2012). Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **5**(6), 485-497.
- 34.** Singha, U. K., Guru, P. Y., Sen, A. B., Tandon, J. S. (1992). Antileishmanial activity of traditional plants against *Leishmania donovani* in golden hamsters. *International journal of pharmacognosy*, **30**(4), 289-295.
- 35.** Soto, J., Soto, P. (2006). Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. *Biomédica*, **26**, 207-217.
- 36.** Spickler, A. R., Roth, J. A., Galyon, J., Lofstedt, J., Lenardón, M. V. (2011). *Enfermedades emergentes y exóticas de los animales*. A. R. Spickler, & M. V. Lenardon (Eds.). CFSPH Iowa State University.
- 37.** Tandon, J. S., Srivastava, V., Guru, P. Y. (1991). Iridoids: a new class of leishmanicidal agents from *Nyctanthes arbor-tristis*. *Journal of Natural Products*, **54**(4), 1102-1104.
- 38.** Tempone, A. G., da Silva, A. C. M. P., Brandt, C. A., Martinez, F. S., Borborema, S. E. T., da Silveira, M. A. B., de Andrade, H. F. (2005). Synthesis and antileishmanial activities of novel 3-substituted quinolines. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **49**(3), 1076-1080.

39. Torrealba Ordaz, C. L. 2015. Efecto de las 7-cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas sobre *Leishmania mexicana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
40. Valdivieso, E., Rangel, A., Moreno, J., Saugar, J. M., Cañavate, C., Alvar, J., Dagger, F. (2010). Effects of HIV aspartyl-proteinase inhibitors on *Leishmania* sp. *Experimental parasitology*, **126**(4), 557-563.
41. Veeresham, C. (2012). Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, **3**(4), 200–201.
42. Wink, M. (2012). Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules*, **17**(11), 12771-12791.
43. World Health Organization. (2010). Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, Switzerland, 22-26 March 2010. *WHO technical report series*, (949).
44. Yardley, V., Croft, S. L., De Doncker, S., Dujardin, J. C., Koirala, S., Rijal, S. Chappuis, F. (2005). The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **73**(2), 272-275.
45. Zulfiqar, B., Shelper, T. B., & Avery, V. M. (2017). Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. *DrugDiscoveryToday*.

Consultas en línea:

1. *Boletín epidemiológico. Semana epidemiológica N°52* [en línea] 2016. Consultado: 02 de agosto de 2017. Disponible: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=941

2. *Centro de prensa. Leishmaniasis* [en línea] 2016. Consultado: 30 de marzo de 2017. Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
3. *Weeklyepidemiological record* [en línea] 2016. Consultado: 30 de octubre de 2016. Disponible: <http://www.who.int/wer/2016/wer9122.pdf?ua=1>