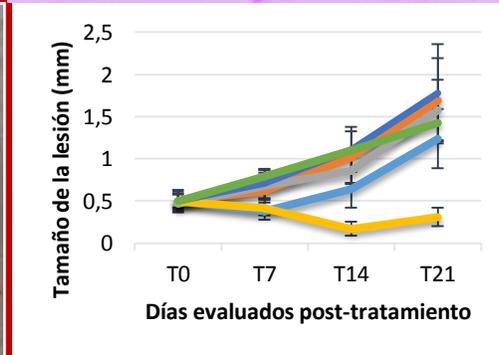
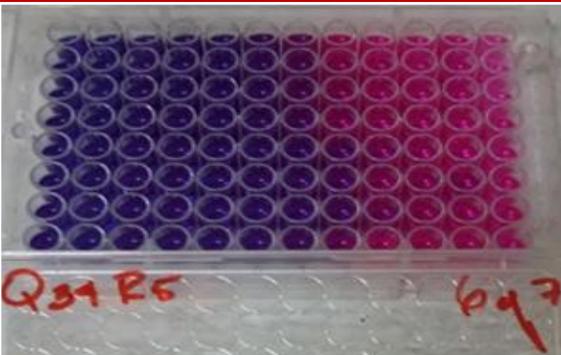
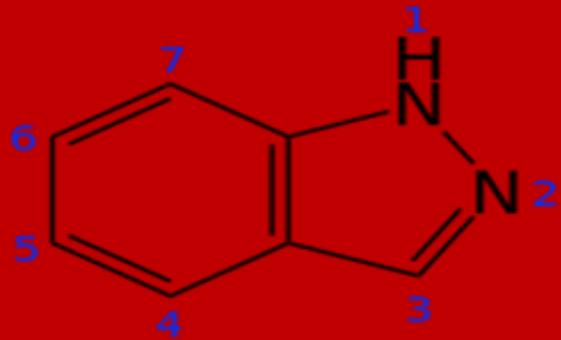


Tesis para optar por el título de Máster en Parasitología



Actividad *in vitro*, *in silico* e *in vivo* de derivados indazoles sobre *Leishmania amazonensis*

Claudia S. Chaviano Montes de Oca

Septiembre, 2019





Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"
Centro de Bioactivos Químicos



Título: Actividad *in vitro*, *in silico* e *in vivo* de derivados
indazoles sobre *Leishmania amazonensis*

Autor: Lic. Claudia S. Chaviano M. de Oca

Tutor: DrMV. Sergio Sifontes Rodríguez, DrC.
Lic. Lianet Monzote Fidalgo, DrC.

Asesora: DrMV. Niurka Mollineda Diogo, MSc.

Tesis para optar por el Título de Máster en Parasitología

La Habana, 2019

Pensamiento

Para curar una enfermedad primero hay que curar ratones.

Ana Mingorance

A mis padres...

Agradecimientos

A Dios, porque cuando la ciencia termina sus largas explicaciones el comienza a darle sentido a todo.

A mis padres, porque no me atrevería a tomar una decisión sin estar respaldada por ellos, de lo contrario sería un total fracaso. Mis triunfos y mis metas alcanzadas están dirigidos por ellos.

A mi tutor el DrC Sergio Sifontes por confiar en mí para esta investigación, enseñarme y apoyarme. Él y el DrC Alfredo Meneses facilitaron el camino para llegar hasta aquí y me enseñaron a amar la parasitología.

A mi tutora la DrC Lianet Monzote, increíble como profesional y en lo personal. Gracias por aceptarme en su laboratorio y hasta en su casa. Gracias por enseñarme todo el tiempo, por aceptar horas extras de trabajo y noches agotadoras y aun así permitir que me quede un tiempito más.

A mi asesora la MSc Niurka Mollineda es mi profesora, mi colega y una amiga necesaria en estos últimos tiempos. Gracias por estar ahí siempre que lo necesité para trabajar, conversar y hasta tomar helado.

Al Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” por brindarme esta oportunidad de superación y a su claustro de profesores especialmente el Departamento de Parasitología. Agradezco cada atención que tuvieron. Las horas en el micro con la profe Iraís, las preguntas sorpresas del profesor y DrC Luis Jerez, las propuestas de trabajo de la DrC Lázara Rojas, las atenciones incansables de Isabel y la presión no tan mala de la DrC Hilda. Sin seguir nombrando les agradezco a todos por sus enseñanzas y por hacerme sentir como en casa, junto a colegas y excelentes personas, agradezco la preocupación y tiempo destinado a mi superación y por supuesto agradezco los cafecitos. Le doy gracias a los profesores y doctores del Departamento de Vectores porque igualmente han formado parte de mi preparación y siempre han mezclado lo profesional con una pizca de atención personal.

Al Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas por permitirme cumplir esta sueño y contar con su apoyo. Especialmente a mis colegas y amigos del Área Biológica. Edy, Osmany, Miri, Zoe, Cary de todos he recibido ayuda y atenciones materiales y espirituales.

Agradecimientos

A mis compañeros de estudio Ana Mary, Alejandro, Karla y Yonnatan porque formamos un súper equipo de estudio y amistad. Porque conocerlos y hacer tareas juntas fue como iniciar de nuevo en la universidad; especialmente Ana quien me dio apoyo material para realizar esta investigación.

A mi colega Juan Luis porque fue un placer conocerlo y compartir estos meses de enseñanza y mucho trabajo. Agradezco sus atenciones aunque se quede debiendo una visita a Coppelia.

A mis amigos, sin mencionar ningún nombre porque ellas y ellos saben quiénes son. Todos lejos pero siempre pendientes de cada paso que doy y recibiendo su apoyo incondicional. Saber que están del otro lado del teléfono muchas veces es un alivio.

Espero y deseo no olvidar a nadie. Con todo mi corazón agradezco a cada persona que conocí, que me ayudó y que apoyaron la decisión de estar este tiempo lejos de casa para mi superación personal.

Resumen

La leishmaniasis es causada por protozoos parásitos del género *Leishmania*, que son transmitidos por la picadura de flebótomos infectados. En la actualidad, no existe una vacuna contra esta enfermedad y los medicamentos disponibles presentan limitaciones por su toxicidad, alto costo y resistencia de los parásitos. Algunos derivados indazoles han demostrado actividad *in vitro* e *in vivo* frente a *Trichomonas vaginalis* y *Trypanosoma cruzi*. Siguiendo estos antecedentes se decidió evaluar la actividad de 41 derivados indazoles sobre *Leishmania amazonensis* en modelos *in vitro*, *in silico* e *in vivo*. Se evaluó la actividad en estudios *in vitro* sobre promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis* y se determinó la citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales. Con los resultados *in vitro*, se identificaron los sustituyentes que aportaban mayor actividad/selectividad utilizando el programa SARANEA. Finalmente, se estudiaron los compuestos frente a la leishmaniasis cutánea experimental en ratones BALB/c. En los estudios *in vitro*, 16 compuestos demostraron $CI_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ sobre promastigotes y un índice de selectividad > 10 . Entre ellos, 10 mostraron $CI_{50} < 3 \mu\text{g/mL}$ sobre amastigotes intracelulares. En los estudios *in silico*, los compuestos fueron separados en dos grupos de acuerdo a las estructuras químicas, la pirrolidina y las aminas terciarias fueron las cadenas laterales que más influencia tuvieron en la actividad de los compuestos. En el modelo *in vivo* fueron evaluados tres compuestos, de los cuales el producto NV13 mostró una actividad significativa ($p < 0,05$) al compararlo con el grupo control no tratado y similar ($p > 0,05$) con el grupo tratado con anfotericina B. Los ensayos realizados evidenciaron la potencialidad de los derivados indazoles como agentes antileishmaniales.

Abstract

Leishmaniasis are a group of parasitic diseases caused by different protozoan species of *Leishmania* genus, transmitted by infected phlebotomine. Currently, a vaccine is yet to be produced and the therapies are inadequate by high toxicities, prices and the emergence of resistant parasites. Some indazoles derivatives have showed activity *in vitro* and *in vivo* against *Trichomonas vaginalis* and *Trypanosoma cruzi*. Following these previous reports, we have been evaluated the potentialities of 41 indazole derivatives against *Leishmania amazonensis* *in vitro*, *in silico* and *in vivo* models. We determine the cytotoxicities of compounds against macrophages peritoneal. We evaluate the activity of the products *in vitro* study on promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis*. With results on promastigotes we determine de structure-activity relationship (SAR) in SARANEA software. Finally, compounds were studied on experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. In the *in vitro* studies, 16 compounds were selected due to demonstrate: $IC_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ against promastigotes and selectivity indexes > 10 . Among them 10 showed $IC_{50} < 3 \mu\text{g/mL}$ on amastigote. In the *in silico* studies, compounds were grouped in two main cluster according the chemical structures, which the pyrrolidine and tertiary amines were the lateral side that most influence in the activity of compounds. In the *in vivo* model, three compounds were evaluated in BALB/c mice. Among them, the NV13 was the best compound, which significantly decrease ($p < 0.05$) the lesion size in relation to untreated animals and treated mice with amphotericin B. The results evidenced the potential antileishmanial activity of indazol derivatives.

Abreviaturas

Abreviaturas

A

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AmB: Anfotericina B desoxicolato de sodio

ARN: Ácido ribonucleico

C

CBQ: Centro de Bioactivos Químicos, Villa Clara, Cuba

CC₅₀: Concentración Citotóxica Media

CCEP: Comisión Científica Especializada de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, La Habana, Cuba

CEI: Comité de Ética Institucional del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, La Habana, Cuba

CCEP: Comisión Científica Especializada de Parasitología,

CD4+: Células T CD4+

CD8+: Células T citotóxicas

CENPALAB: Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Mayabeque, Cuba

CI₅₀: Concentración Inhibitoria Media

CMC: Carboximetil-celulosa

CP: Carga Parasitaria

CPM: Concentración Parasitocida Media

D

DAT: Ensayo de aglutinación directa (de sus siglas en inglés *Direct Agglutination Test*)

dCI₅₀: Valores de deseabilidad de la CI₅₀ sobre promastigotes de *L. amazonensis*

dCC₅₀: Valores de deseabilidad de la CC₅₀

DDT: Diclorodifeniltricloroetano

DE: Desviación estándar

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMT: Dosis Máxima Tolerada

E

Abreviaturas

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (de sus siglas en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

H

h: horas

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

I

IFA: Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (de sus siglas en inglés *Indirect Fluorescent Assay*)

IFN- γ : Interferón gamma

IL: Interleucina

IPK: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, La Habana, Cuba

IS: Índice de Selectividad

L

LC: Leishmaniasis Cutánea

LCD: Leishmaniasis Cutánea Difusa

LCR: Leishmaniasis Cutánea Recidiva

LMC: Leishmaniasis Mucocutánea

LPKA: Leishmaniasis Dérmica Post-kala-azar

LV: Leishmaniasis visceral

M

min: minutos

N

NSG: Redes de similitud estructural (de sus siglas en inglés *Network-Like Similarity Graphs*)

O

OECD: Organización Económica para la Cooperación y Desarrollo

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

Abreviaturas

P

p.i.: Post-infección

p.t.: Post-tratamiento

R

RCP: Reacción en cadena de la polimerasa

RI: Reducción de la Infección

RPMI 1640: Medio *Roswell Park Memorial Institute* 1640

S

SAR: Relación estructura-actividad (de sus siglas en inglés *Structure-Activity Relation*)

Sb^{III}: Antimonio trivalente

Sb^V: Antimonio pentavalente

SFB: Suero Fetal Bovino

T

Th1: Células T cooperadoras tipo 1

Th2: Células T cooperadoras tipo 2

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa (de sus siglas en inglés *Tumor Necrosis Factor*)

V

Vero: Línea celular aislada de células epiteliales de riñón del mono verde africano
(*Cercopithecus aethiops*)

1. Introducción.....	1
2. Objetivos	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. Revisión Bibliográfica.....	5
3.1 Taxonomía.....	5
3.1.1 Agente etiológico.....	5
3.1.2 Ciclo biológico	6
3.2 Epidemiología.....	7
3.2.1 Vectores.....	8
3.2.2 Reservorios.....	8
3.3 Formas clínicas.....	9
3.3.1 Leishmaniasis cutánea.....	9
3.3.2 Leishmaniasis Mucocutánea.....	10
3.3.3 Leishmaniasis visceral	11
3.4 Inmunología	13
3.5 Diagnóstico	13
3.6 Control de la leishmaniasis	14
3.7 Fármacos antileishmaniales.....	15
3.7.1 Antimonios pentavalentes	15
3.7.2 Anfotericina B.....	16
3.7.3 Pentamidina	17
3.7.4 Miltefosina.....	18
3.8 Indazoles estudiados	19
4. Materiales y métodos.....	24
4.1 Parásito.....	24
4.2 Animales de laboratorio	25
4.3 Extracción de macrófagos peritoneales.....	25
4.4 Productos a evaluar	26
4.5 Fármacos de referencia.....	26
4.6 Selección de los derivados indazoles promisorios a partir de estudios <i>in vitro</i> de actividad antileishmanial y citotoxicidad.....	26
4.6.1 Actividad <i>in vitro</i> de los derivados indazoles sobre promastigotes de <i>L. amazonensis</i>	26

4.6.2 Citotoxicidad de los derivados indazoles sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c	27
4.6.3 Actividad <i>in vitro</i> de los derivados de indazoles sobre amastigotes intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	28
4.6.4 Índice de selectividad	29
4.6.5 Criterios de selección	29
4.7 Selección de las cadenas laterales que aportan mayor actividad y selectividad de derivados indazoles a través de su relación estructura-actividad	29
4.7.1 Colección de los datos	30
4.7.2 Codificación estructural	30
4.7.3 Redes de similitud estructural	30
4.8 Evaluación del efecto de los derivados indazoles seleccionados en ratones BALB/c infectados experimentalmente con <i>L. amazonensis</i>	31
4.8.1 Determinación de Dosis Máxima Tolerada	31
4.8.2 Evaluación de los derivados indazoles seleccionados en ratones BALB/c infectados experimentalmente con <i>L. amazonensis</i>	31
4.9 Análisis estadístico	33
4.10 Consideraciones éticas	33
5. Resultados	34
5.1 Selección de los derivados indazoles promisorios a partir de estudios <i>in vitro</i> de actividad antileishmanial y citotoxicidad.....	34
5.1.1 Actividad <i>in vitro</i> de los derivados indazoles sobre a promastigotes de <i>L. amazonensis</i>	34
5.1.2 Citotoxicidad de los derivados indazoles sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c	34
5.1.3 Actividad <i>in vitro</i> de los derivados indazoles sobre amastigotes intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	36
5.2 Selección de las cadenas laterales que aportan mayor actividad y selectividad de derivados indazoles a través de su relación estructura-actividad	38
5.3 Evaluación del efecto de los derivados indazoles seleccionados en ratones BALB/c infectados experimentalmente con <i>L. amazonensis</i>	41
5.3.1 Determinación de Dosis Máxima Tolerada	42
5.3.2 Evaluación de los derivados indazoles seleccionados en ratones BALB/c infectados experimentalmente con <i>L. amazonensis</i>	43
6. Discusión.....	47
6.1 Selección de los derivados indazoles promisorios a partir de estudios <i>in vitro</i> de actividad antileishmanial y citotoxicidad.....	48

Índice

6.2 Selección de las cadenas laterales que aportan mayor actividad y selectividad de derivados indazoles a través de su relación estructura-actividad.	51
6.3 Evaluación de los derivados indazoles seleccionados en ratones BALB/c infectados experimentalmente con <i>L. amazonensis</i>	52
6.4 Discusión general	54
7. Conclusiones.....	56
8. Recomendaciones	57
9. Bibliografía.....	58

1. Introducción

La leishmaniasis comprende un conjunto de enfermedades provocadas por protozoos parásitos de la familia Trypanosomatidae, clase Kinetoplastida, género *Leishmania* (Kaufer *et al.*, 2017). En la actualidad, se describen 18 especies de *Leishmania* patógenas al hombre. La forma natural de transmisión es vectorial, por dípteros de la familia Psychodidae, del género *Lutzomya* en el continente americano y *Phlebotomus* en Europa, Asia y África (Sacks y Kamhawi, 2001). El ciclo de vida de este parásito comprende dos estadios: el promastigote, extracelular, alargado y flagelado, presente en el insecto vector; y el amastigote, ovalado e inmóvil, intracelular obligado en células mononucleadas como los macrófagos en el huésped vertebrado (Kaye y Scott, 2011).

Esta parasitosis es endémica en regiones tropicales y subtropicales de 98 países de Asia, África, América y la región del Mediterráneo, 72 de ellos en vías de desarrollo (PAHO/WHO, 2018). Actualmente, se estiman de 12 a 15 millones de personas infectadas en todo el mundo, 350 millones en riesgo de adquirir la enfermedad y una prevalencia de 1,2 a 2 millones de casos nuevos cada año con 70 000 defunciones (Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

En los últimos 25 años, han aumentado los casos de leishmaniasis en todo el mundo debido a varios factores. En primer lugar, la globalización y el cambio climático favorecen la presencia de la enfermedad en áreas no endémicas (Steverding, 2017). Otras acciones como la deforestación, inmunosupresión (pacientes con el Virus de Inmunodeficiencia Humana, trasplantes de órganos o inmunoterapias), el desarrollo de resistencia a los fármacos convencionales, las migraciones, la importación de perros, las guerras y los desastres naturales, son factores que favorecen la distribución mundial de la enfermedad (Okwor y Uzonna, 2016).

El desarrollo de esta parasitosis depende de las características del parásito y la genética del hospedero que determina o no una efectiva respuesta inmune. De acuerdo con las manifestaciones clínicas, se describen tres formas principales: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV). La LC se manifiesta con lesiones en la piel que pueden llegar a ulcerar y, en general, curan espontáneamente. La LMC compromete fundamentalmente la boca, nariz y garganta, provocando la destrucción de los tejidos blandos, por lo que puede llegar a ser fatal. La LV afecta sobre

Introducción

todo el bazo, el hígado y la médula ósea, siendo letal en la mayoría de los casos no tratados (Reithinger *et al.*, 2007; Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

La vacunación podría constituir el método más seguro para la prevención de esta enfermedad, ya que la estimulación de una respuesta inmune protectora mediada por células cooperadoras tipo 1 (Th1, del inglés *T helper*) y citotóxicas (CD8+) contribuyen a eliminar la infección. Sin embargo, en la actualidad no se dispone de una vacuna eficaz y segura para prevenir la leishmaniasis (Kumar *et al.*, 2017). Existen otras medidas principalmente en áreas endémicas encaminadas al control de vectores, la educación sanitaria y la eliminación de los reservorios, pero no son suficientes para disminuir el número de casos nuevos que se presentan cada año (Davies *et al.*, 2003; Alvar *et al.*, 2012).

En muchos países, los derivados de antimonio pentavalente son aún los fármacos antileishmaniales de primera línea; pero su utilización ha disminuido con el aumento de la resistencia (Jeddi *et al.*, 2011). Como segunda línea, se recomiendan la pentamidina y la anfotericina B (AmB); aunque su utilización se ve limitada por la toxicidad, alto costo y la necesidad de hospitalizar a los pacientes para la administración y monitoreo de los efectos adversos (Oliveira *et al.*, 2011). La miltefosina es otra de las alternativas terapéuticas, y sus principales ventajas incluyen la administración oral y corta duración del tratamiento. Sin embargo, sus efectos teratogénicos constituyen una limitación (Ghorbani y Farhoudi, 2018). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas eficaces y seguras para el tratamiento de esta enfermedad continúa siendo una necesidad.

A lo largo de los años, se han llevado a cabo distintas estrategias para el desarrollo de nuevos fármacos contra la leishmaniasis (Monzote, 2011; Gómez V, 2013; Grogl *et al.*, 2013). Entre ellas, se distingue la evaluación de familias de compuestos obtenidos por síntesis química en busca de nuevos agentes antileishmaniales. En estudios previos, fueron estudiados diferentes derivados del 5-nitroindazol frente a *Trypanosoma cruzi* (Fonseca-Berzal *et al.*, 2016; Fonseca-Berzal *et al.*, 2018) y *Trichomonas vaginalis* (Fonseca-Berzal *et al.*, 2018) con resultados alentadores. Posiblemente, el mecanismo de acción de estos compuestos esté relacionado con la formación de radicales libres que causan un desbalance del estado redox en el parásito y como consecuencia la muerte celular (Boiani *et al.*, 2009). Considerando las potencialidades de estos compuestos frente a diferentes protozoos relacionados desde el punto de vista genético con *Leishmania*, en particular *T. cruzi* que pertenece a la misma familia Trypanosomatidae, y el posible

Introducción

mecanismo antiparasitario sugerido, en el presente trabajo se evalúan 41 compuestos pertenecientes a cuatro series de derivados del 5-nitroindazol frente a *L. amazonensis* en modelos *in vitro*, *in silico* e *in vivo*.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antileishmanial de 41 derivados indazoles *in vitro*, *in silico* e *in vivo* sobre *L. amazonensis*.

2.2 Objetivos específicos

1. Seleccionar los derivados indazoles promisorios a partir de estudios *in vitro* de actividad antileishmanial y citotoxicidad.
2. Determinar las cadenas laterales que aportan mayor actividad y selectividad en los derivados indazoles a través de su relación estructura-actividad.
3. Evaluar el efecto de los derivados indazoles seleccionados frente la LC en ratones BALB/c infectados experimentalmente con *L. amazonensis*.

Revisión bibliográfica

3. Revisión Bibliográfica

3.1 Taxonomía

Los primeros estudios sobre la taxonomía del parásito *Leishmania* estaban basados en criterios como vectores, distribución geográfica, tropismo, propiedades antigénicas y manifestaciones clínicas (Bray, 1974; Lumsden, 1974; Pratt y David, 1981; Lainson y Shaw, 1987). Actualmente, se propone una clasificación basada en los datos de distribución geográfica, síntomas clínicos asociados y desarrollo en el insecto vector en combinación con marcadores bioquímicos, inmunológicos y moleculares. A continuación se muestra la taxonomía de las especies de *Leishmania* donde el hombre actúa como reservorio (Akhoundi *et al.*, 2017).

Reino: Protista							
Phylum: Protozoa							
Clase: Zoomastigophorea							
Orden: Kinetoplastida							
Familia: Trypanosomatidae							
Euleishmania	Leishmania	Complejo	<i>L. major</i>	Especies	<i>L. major</i>		
			<i>L. tropica</i>		<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i>	
			<i>L. donovani</i>		<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i>	
			<i>L. mexicana</i>		<i>L. mexicana</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. venezuelensis</i>
	Viannia		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. braziliensis</i>	<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. guyanensis</i>		<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. shawi</i>
			<i>L. lainsoni</i>		<i>L. naiffi</i>	<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. enrietti</i>		<i>L. siamensis</i>		
			<i>L. herreri</i>		<i>L. colombiensis</i>		

3.1.1 Agente etiológico

El parásito *Leishmania* tiene dos estadios fundamentales en su ciclo de vida: promastigote y amastigote (Figura 1 y 2, respectivamente). Los promastigotes son móviles, alargados, de 10-15 µm de longitud, con un solo flagelo anterior. Son extracelulares y se encuentran en el insecto vector. En cambio, los amastigotes son inmóviles, tienen forma esférica, de

Revisión bibliográfica

3-5 μm de longitud, sin flagelo, son intracelulares obligados y están presentes en el hospedero vertebrado (Dawit *et al.*, 2013).

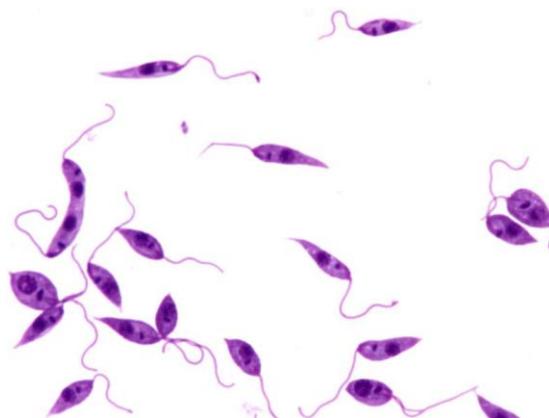


Figura 1 Promastigotes móviles de *Leishmania* teñidos con Giemsa. (Tomado de https://www.google.com/search?q=Leishmania&source=Inms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKewi33Knk78jkAhWhzlkKHakqDjcQ_AUIEigB#imgdii=1O8ZdPlsqBiWrM:&imgsrc=yDpsX9W7sL_AYM:Promastigote)

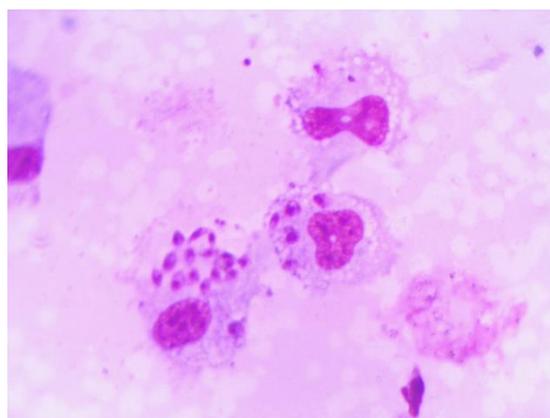


Figura 2 Macrófagos peritoneales de ratón BALB/c infectados con amastigotes de *L. amazonensis*, teñidos con la técnica de Giemsa. Aumento 1000x. (Foto tomada por los autores en el Laboratorio de Parasitología del Centro de Bioactivos Químicos, Villa Clara).

3.1.2 Ciclo biológico

El ciclo de vida comienza cuando una hembra del insecto vector toma sangre para alimentarse de un vertebrado hospedero infectado. Una vez en el vector adopta la forma de promastigote en el intestino, se multiplican y migran a la cavidad bucal. Cuando el insecto realiza una segunda toma de sangre en un hospedero sano lo infecta con el parásito a través de la transmisión de promastigotes metacíclicos. La diferenciación a

Revisión bibliográfica

amastigotes ocurre dentro de los macrófagos maduros, sus dianas principales, allí sobreviven a las altas temperaturas y pH bajo de los fagolisosomas y se multiplican hasta causar la lisis de estas células. Los amastigotes libres pueden infectar nuevos macrófagos, diseminando la infección hasta causar las primeras manifestaciones clínicas (Dawit *et al.*, 2013; Rossi y Fasel, 2017). En la Figura 3 se muestra el ciclo de vida de *Leishmania*.

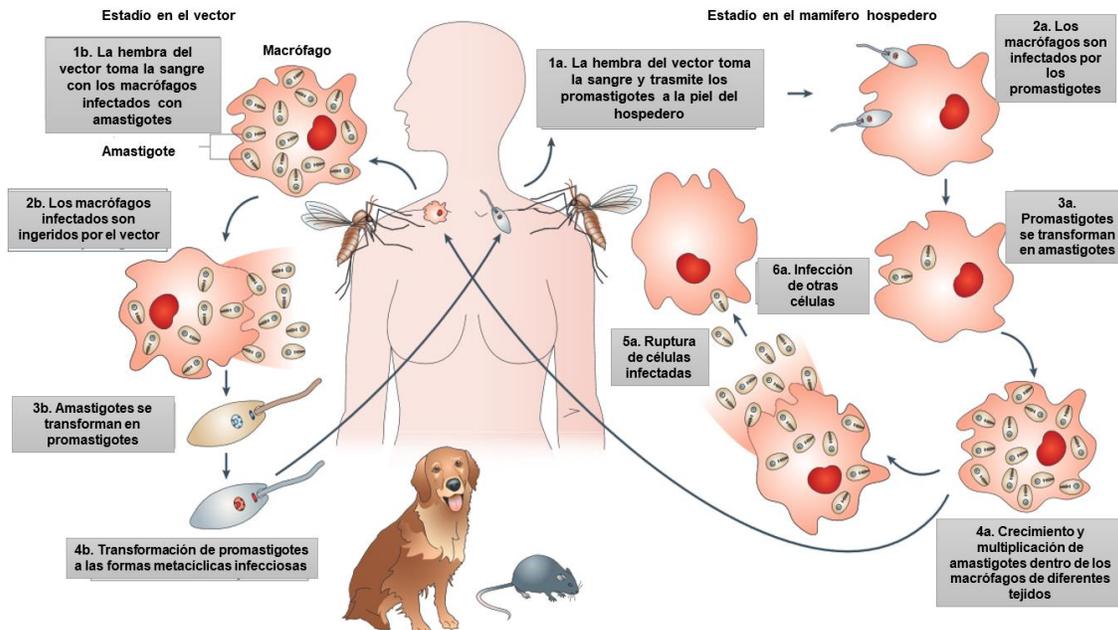


Figura 3 Ciclo de vida de *Leishmania*. (Tomado de Lipoldová y Demant, 2006)

3.2 Epidemiología

La leishmaniasis es una enfermedad presente en Asia, África, América y la región del Mediterráneo (Torres-Guerrero *et al.*, 2017). Su distribución geográfica depende tanto de los flebótomos como de las condiciones de desarrollo del parásito (Dawit *et al.*, 2013). Entre las enfermedades parasitarias, la leishmaniasis ocupa el segundo lugar en cuanto a mortalidad y el cuarto en morbilidad después de la malaria, la esquistosomiasis y la diarrea amebiana (Savoia, 2015). A pesar de alcanzar estas cifras, la leishmaniasis es ignorada en la lista de prioridades de las enfermedades tropicales. Las razones son: compleja epidemiología y ecología, imposibilidad para gestionar los casos, la desactualización de los datos sobre incidencias recientes y el poco apoyo de las autoridades pertinentes para reconocer su importancia (Alvar *et al.*, 2012).

En un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2012 para conocer la carga y distribución de la leishmaniasis, se informa que el 90% de los casos

Revisión bibliográfica

globales de LV ocurrieron en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India y Sudán; 70% de los casos de LC ocurrieron en Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Etiopía, Irán, Sudán y la República Árabe Siria. Entre estos, Brasil constituyó el país de mayor carga en ambas formas clínicas (Alvar *et al.*, 2012). A pesar de estos datos, hay una subestimación de la incidencia y prevalencia real de esta parasitosis, ya que de los 98 países endémicos, solo en 52 es de notificación obligatoria. Por tanto, los datos que se presentan a nivel mundial no muestran la realidad de esta enfermedad para los humanos. Algunos de los factores que contribuyen a esta problemática son: transmisión discontinua en áreas endémicas y muchos casos no son diagnosticados o no se declaran (Silveira *et al.*, 2007).

3.2.1 Vectores

Los vectores de *Leishmania* son conocidos en algunas regiones como flebotómicos. Se han descrito seis géneros, de ellos solo los dos que se mencionan a continuación tienen importancia médica: *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Para que la transmisión se realice con éxito, el parásito necesita vencer diferentes obstáculos entre los cuales está infectar la especie de flebótomo correcta. Entre las más de 900 especies de vectores conocidos de flebótomos, solo 98 son transmisores probados de leishmaniasis humana, 42 especies de *Phlebotomus* y 56 especies de *Lutzomyia* (Telleria *et al.*, 2018). Este insecto se encuentra en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Es pequeño (aproximadamente 2–3 mm de longitud), son insectos peludos y con vuelo silencioso. En general, estas especies de flebótomos habitan en ecosistemas desérticos o semiáridos, dentro de las viviendas de los humanos o en áreas peridomésticas (Sharma y Singh, 2008).

3.2.2 Reservorios

Los reservorios animales son importantes para el mantenimiento del ciclo de vida de algunas especies de *Leishmania* y para la transmisión de la infección zoonótica y selvática. Para que un animal sea considerado un reservorio debe portar suficientes parásitos para que el vector realice una toma efectiva y la infección debe ser relativamente no patógena o asintomática para no afectar la supervivencia del reservorio. En general, más de la mitad de los reservorios permanecen asintomáticos (Torres-Guerrero *et al.*, 2017). Diferentes especies de mamíferos salvajes, domésticos y

Revisión bibliográfica

sinantrópicos han sido reconocidas como hospederos y/o reservorios de *Leishmania* spp. en diferentes partes del mundo. Entre ellos se han descrito: roedores, damanes, mangostas, armadillos, perros, gatos, zorros, chacales, lobos, murciélagos, primates, entre otros. En estos mamíferos, la piel y la sangre proporcionan entornos adecuados para la reproducción del parásito (Alemayehu y Alemayehu, 2017).

3.3 Formas clínicas

3.3.1 Leishmaniasis cutánea

La LC es la manifestación clínica más frecuente. Generalmente, no representa un riesgo para la vida, pero sí puede llegar a ser socialmente limitante debido a las lesiones desfigurantes o deshabilitantes que provoca. Ocurre fundamentalmente en áreas del cuerpo expuestas a la picada del insecto, como: orejas, nariz, labios, mejillas, manos, brazos, antebrazos y tobillos (Scorza *et al.*, 2017).

El período de incubación varía de 1-4 semanas, durante el cual el parásito permanece en la piel. Se caracteriza por un aumento de la temperatura e hinchazón en el sitio de infección. Comienza en el sitio de la picada con una pápula eritematosa que puede presentar prurito. Posteriormente, se transforma en vesícula, después pústula y al romperse queda visible una úlcera redondeada, nodular o con bordes agudos y puntiagudos. El fondo puede mostrar tejido de granulación con una periferia rosada intensa. Puede observarse una pseudomembrana blanquecina. El tiempo que puede tardar una úlcera en sanar varía desde 3-5 meses hasta 15-20 años (Torres-Guerrero *et al.*, 2017). La figura 4 muestra algunos ejemplos.



Figura 4 Ejemplos de úlceras de leishmaniasis cutánea (Tomado de https://www.google.com/search?tbm=isch&q=Leishmania&chips=q:leishmania,online_chips:cutaneous+leishmaniasis&sa=X&ved=0ahUKEwiOoL3v78jkAhUCzlkKHYrXBboQ4IYILygH&biw=1366&bih=657&dpr=1#imgrc=)

Revisión bibliográfica

La lesión no es dolorosa si no coexiste infección secundaria. Generalmente, no presenta un cuadro febril y sí adenopatía regional. Conduce a úlceras crónicas de cicatrización lenta, puede sanar sin tratamiento o puede dejar cicatrices (deprimida e hipopigmentada) en muchos casos desfigurantes. La resolución de la lesión no corresponde a una cura parasitológica completa, ya que se ha comprobado la presencia de parásitos o ADN en pacientes con cicatrices después de años de tratamiento exitoso y curación clínica (Scorza *et al.*, 2017).

La LC en humanos es causada por varias especies de *Leishmania* en regiones tanto tropicales como subtropicales. Del subgénero *Leishmania* en África y Asia pueden nombrarse los complejos *Leishmania (Leishmania) major* y en América Central y del Sur, *Leishmania (Leishmania) mexicana*. También puede ser causada por las especies del subgénero *Viannia*, las cuales están restringidas a América Latina, por ejemplo el complejo *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Ready, 2014).

Con menor frecuencia, en lugares y con especies de *Leishmania* determinadas puede presentarse la leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Es una manifestación severa de la LC caracterizada por una respuesta inmune deficiente. Se presenta como una miríada de lesiones en forma de pápulas, placas o nódulos diseminados por toda la superficie corporal. No cura espontáneamente y los pacientes tienden a la recaída (Kumar *et al.*, 2017).

Otro ejemplo de leishmaniasis que se observa con menor frecuencia es la leishmaniasis cutánea recidiva (LCR). Aparecen como lesiones activas alrededor o dentro de la cicatriz de la LC clásica. En la literatura se considera como una forma hiperérgica de LC porque los pacientes muestran una fuerte respuesta a las pruebas intradérmicas con antígenos de *Leishmania*. Los pacientes son tratados con los fármacos antileishmaniales convencionales observándose mejoría en los primeros meses pero no cura definitiva (Ekiz *et al.*, 2015; Faccini-Martínez y Falqueto, 2016).

3.3.2 Leishmaniasis Mucocutánea

La LMC puede ocurrir como una complicación de la LC. Se han observado tanto simultáneamente con la LC como meses o años después de la resolución de las lesiones primarias, lo que sugiere la existencia de parásitos latentes. Las lesiones metastásicas aparecen en la superficie de la mucosa de las vías respiratorias superiores y del tracto

Revisión bibliográfica

digestivo. Las áreas afectadas pueden incluir mucosa nasal, paladar blando, faringe, laringe, labios o mejillas y en raras ocasiones, la tráquea, los ojos o genitales. Cuando progresa es altamente desfigurante y puede estar acompañada por la destrucción extensa de los tejidos (Scorza *et al.*, 2017). La figura 5 muestra algunos ejemplos.

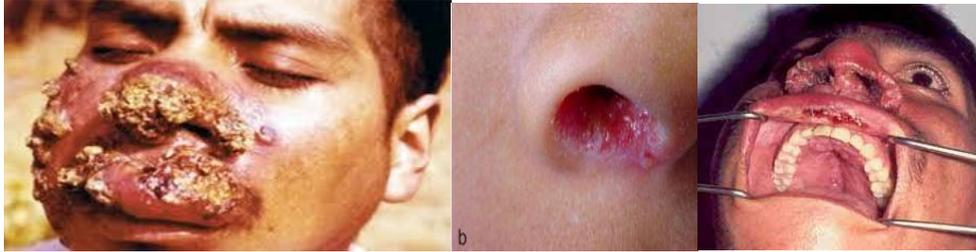


Figura 5 Ejemplos de lesiones de LMC. (Tomado de https://www.google.com/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=V_l4XZueFdLc5gLZuZX4BA&q=leishmaniasis+mucocut%C3%A1nea&oq=Leishmanias&gs_l=img.1.5.0i67j0l3j0i67j0l5.700283.700283.704805...0.0..0.810.810.6-1.....0....1..gws-wiz-img.b8BVkoSpzQo#imgrc=)

El síntoma de presentación más común es la congestión nasal persistente. Se observan eritemas, erosiones y úlceras alrededor de las fosas nasales y los labios a medida que progresa la enfermedad. Estos hallazgos son a veces bastante sutiles y se confunden comúnmente con el impétigo contagioso o se diagnostica de forma errónea como rinoscleroma o granulomatosis de Wegner. Las lesiones de la orofaringe pueden ir seguidas de una enfermedad cutánea más extendida. Estas manifestaciones son difíciles de resolver con los fármacos y como resultado son altamente letales (David y Croft, 2009).

Las especies de *Leishmania* que se asocian a esta enfermedad son: *L. braziliensis* en la mayoría de los casos, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* y *L. amazonensis*. Estas especies solo circulan y se transmiten en América Latina (Akhoundi *et al.*, 2016).

3.3.3 Leishmaniasis visceral

La LV es una enfermedad progresiva y una infección sintomática donde los casos no tratados son generalmente fatales. El período de incubación varía de 2 semanas a 18 meses, con las reacciones inflamatorias en las vísceras que a menudo tardan en desarrollarse de 2-8 meses después de la infección pero los síntomas de la LV pueden tardar años en aparecer (Ready, 2014).

Revisión bibliográfica

En esta forma de la leishmaniasis, ocurre la liberación de amastigotes por parte de los macrófagos que favorece la migración de los parásitos a hígado, médula ósea y bazo. Las consecuencias son alteración en la estructura esplénica y reacciones granulomatosas autolimitadas en hígado. Los síntomas más comunes de la LV son fiebre ondulante prolongada, pérdida de peso y del apetito, signos de anemia, distensión abdominal con esplenomegalia y hepatomegalia. Otros síntomas pueden incluir tos, diarrea crónica, oscurecimiento de la piel, linfadenopatía y en muchos casos síntomas de enfermedad crónica de los riñones (Dawit *et al.*, 2013; Tovar y Yasnot, 2017). Cuando las células de la médula ósea son infectadas, el paciente desarrolla pancitopenia que consiste en la depresión de la producción de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. Como resultado aparece una inmunosupresión, haciendo al paciente más susceptible a infecciones oportunistas (Ready, 2014). La figura 6 muestra algunos ejemplos.



Figura 6 Ejemplos de algunos síntomas de LV. (Tomado de https://www.google.com/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=hPx4XYD6J-2mggfin63QDw&q=leishmaniasis+visceral&oq=leishmaniasis+VISC&gs_l=img.1.0.0I10.88558.128340..130450...0.0..0.3504.14835.5-1j0j1j3j3.....0....1..gws-wiz-img.....0i67j0i30j0i5i30.-X-NraksTp8#imgrc=)

Las especies de *Leishmania* causantes de este tipo de leishmaniasis son *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*. En el caso de *L. donovani* se asocia fundamentalmente a Asia y África y su transmisión es mayormente antroponótica. *Leishmania infantum* se encuentra en el Mediterráneo; mientras que *L. chagasi* es endémica de América Latina (Ready, 2014).

Otra manifestación clínica menos frecuente es la leishmaniasis dérmica post-kala-azar (LPKA). Se desarrolla como una complicación de la LV en pacientes aparentemente curados. Se caracteriza por un salpullido cutáneo hipopigmentado de forma macular,

Revisión bibliográfica

maculopapular o nodular donde se pueden encontrar los parásitos. Se ha postulado que la supresión inmune puede permitir la migración de parásitos latentes de las vísceras a la piel (Kumar *et al.*, 2017).

3.4 Inmunología

El parásito *Leishmania* activa predominantemente una respuesta inmune mediada por células T. Poco tiempo después de la infección el parásito es fagocitado por neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Aunque los neutrófilos están entre las primeras células reclutadas al sitio de la infección, su rol en la progresión de la enfermedad es controversial. La función primaria de las células dendríticas es el procesamiento antigénico y la presentación a las células T. Estas células también secretan interleucina 12 (IL-12), la cual es necesaria para la inducción de la respuesta protectora de tipo Th1. Esta respuesta se caracteriza por la producción de interferón gamma (IFN- γ) y/o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α de sus siglas en inglés *Tumor Necrosis Factor*). Estas citoquinas activan los macrófagos que con mayor eficiencia matan los parásitos por la producción de óxido nítrico y especies reactivas del oxígeno. En contraste, la respuesta inmune de tipo 2 (Th2 de sus siglas en inglés *T helper*) favorece la progresión de la enfermedad y está asociada con la producción de IL-10, IL-2 e IL-4 (Silveira *et al.*, 2007; Whyte y Zufferey, 2017).

3.5 Diagnóstico

Los métodos para la detección de *Leishmania* pueden organizarse en diferentes grupos: técnicas convencionales para la detección del parásito, métodos inmunológicos de diagnóstico y técnicas moleculares (Dawit *et al.*, 2013). Dentro de las técnicas convencionales está el examen microscópico. Para la LC es a través de una biopsia de la lesión; mientras que para la LV es por aspirado de bazo, médula ósea y vasos linfáticos. Es un método barato y rápido, pero invasivo, y no discrimina la especie de *Leishmania*. Otro método es el aislamiento en cultivos del parásito, en particular de promastigotes a partir de aspirado de tejido o biopsia. Es un diagnóstico de rutina pero que desafortunadamente es eficiente solo en un 70%, requiere de un laboratorio especializado y personal con experiencia (Bensoussan *et al.*, 2006). También se utilizan los aislados del parásito en animales experimentales infectando los cojinetes plantares, nariz o cola. La

Revisión bibliográfica

evaluación histopatológica puede ser informativa, pero en muchos casos no es suficiente y requiere también de personal con experiencia (Loría-Cervera y Narvaez, 2014). Otro método utilizado se basa en la exposición de un flebotomo a un tejido posible infectado y el posterior análisis del intestino del vector. Es relativamente fácil con alta sensibilidad y especificidad. Su principal desventaja es que no discrimina entre especies de *Leishmania* y son necesarios animales del insectario (Akhoundi *et al.*, 2017).

En los métodos inmunológicos puede nombrarse el test de Montenegro, un diagnóstico basado en una reacción de hipersensibilidad a una inyección con promastigotes muertos. Es útil porque es simple, sensible y específico. Como desventaja tiene que no identifica la especie del parásito y no discrimina entre infecciones pasadas y presente. El ensayo indirecto de inmunofluorescencia (IFA, de las siglas en inglés *Indirect Fluorescent Assay*) se basa en la detección de anticuerpos para *Leishmania* en estadios tempranos de la enfermedad. Aunque es muy utilizado, es de baja sensibilidad y no es útil después de la cura (Figueiredo *et al.*, 2010). Otros métodos similares basados en anticuerpos o antígenos son el ensayo de aglutinación directa (DAT del inglés *Direct Agglutination Test*) (Adams *et al.*, 2012) y el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA de las siglas en inglés *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), los cuales son altamente sensibles y específicos pero no discriminan las especies del parásito (Sundar y Rai, 2002; Dawit *et al.*, 2013)..

Dentro de las técnicas moleculares que más se están utilizando en la actualidad para el diagnóstico y estudios de *Leishmania* es el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de las siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*). Su principio es la amplificación de ADN o ARN del parásito. Es un método superior a los antes mencionados porque logra confirmar muestras con baja carga parasitaria, cuantifica el parásito y monitorea la progresión de la enfermedad con la terapia, es específico en la especie de *Leishmania*. Su principal desventaja está en el requerimiento del equipamiento, reactivos altamente costosos y personal calificado (Akhoundi *et al.*, 2017).

3.6 Control de la leishmaniasis

La obtención de una vacuna contra la leishmaniasis sería el método más económico para prevenir la infección. Una vacuna preventiva que logre inducir una respuesta inmune puede producir linfocitos de memoria que controlen la enfermedad una vez expuestos al

Revisión bibliográfica

parásito. También podría estimular una inmunidad humoral y celular, sobre todo, una respuesta de tipo Th1 para eliminar la infección. Sobre la base de estos conocimientos se han dirigido diversas investigaciones (Savoia, 2015). Sin embargo, no hay disponible una vacuna profiláctica para la prevención de la leishmaniasis, por lo que las medidas de control están dirigidas al tratamiento temprano de los enfermos, el control del vector y de los reservorios.

Algunas de las medidas de control utilizadas contra los vectores es la fumigación en el interior de las viviendas (dicloro difenil tricloroetano (DDT), malatión, deltametrina) y las madrigueras de los roedores, a utilización de los mosquiteros o cortinas impregnadas en insecticidas, los repelentes para insectos y los collares impregnados para perros. La planificación en la expansión urbana basada en la protección ambiental teniendo en cuenta el cierre de los alcantarillados, la higienización, la correcta colecta de basura y la adecuada convivencia con animales domésticos es la clave para lograr la prevención de la leishmaniasis en áreas urbanas. La educación de la comunidad sobre los hábitos alimentarios de estos vectores sobre algunas plantas y los lugares propicios para la puesta y su participación en la eliminación de estos focos permiten su control y disminuir los costos de intervención (Yaghoobi-Ershadi, 2016).

El control de los reservorios de *Leishmania* se ha enfocado fundamentalmente en los caninos domésticos. Una vez detectado un caso positivo se comienza la vigilancia y el tratamiento efectivo. Estas medidas tienen como objetivo prevenir la reinfección, reducir la carga parasitaria y disminuir la transmisión (Quinnell y Courtenay, 2009; Dawit *et al.*, 2013).

3.7 Fármacos antileishmaniales

El tratamiento más efectivo contra la leishmaniasis en la actualidad es la quimioterapia. Los derivados de antimonio pentavalente constituyen en muchos países la primera línea en la quimioterapia antileishmanial. Por lo general, la segunda línea son la AmB y la pentamidina. La miltefosina constituye también una alternativa terapéutica (Ghorbani y Farhoudi, 2018).

3.7.1 Antimonios pentavalentes

De los antimonios pentavalentes se dispone comercialmente de dos formulaciones, Glucantime® (antimoniato de meglumina o N-metil-D-glucamine) y el Pentostam®

Revisión bibliográfica

(estibogluconato de sodio). La vía de administración en cualquiera de los casos es parenteral. Se dosifica en base al contenido de antimonio, generalmente 20 mg/kg/día entre 20-30 días de tratamiento (Frézard *et al.*, 2009). Algunos estudios plantean que el modo de acción de estos compuestos es inhibiendo la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos en el parásito. La reducción de Sb^V a Sb^{III} provoca la muerte del parásito a través de la toxicidad de este último (Herman *et al.*, 1987; Ghorbani y Farhoudi, 2018).

Las desventajas que presentan estos fármacos son el dolor durante la inyección intramuscular y los efectos adversos sistémicos que requieren de la supervisión médica. Pueden observarse náuseas, vómitos, malestar general, cefalea, debilidad, mialgia, artralgia, fiebre y exantema. Con dosis elevadas acumuladas pueden presentarse alteraciones electrocardiográficas, hepatitis y pancreatitis (Frézard *et al.*, 2009). En casos aislados, puede producirse la muerte por la toxicidad del fármaco (Cesur *et al.*, 2002). Otro inconveniente que está presentando este fármaco es la aparición de resistencia de los parásitos, especialmente en la India (Stauch *et al.*, 2012).

3.7.2 Anfotericina B

La AmB es producida por *Streptomyces nodosus*, caracterizada por un anillo macrocíclico de lactona. Es anfipática, posee un dominio hidrofóbico y uno hidrofílico lo cual le confiere baja solubilidad en soluciones acuosas a pH fisiológico. Una de las formulaciones de mayor uso clínico se basa en una dispersión en desoxicolato sódico (Stephens *et al.*, 2012). Este fármaco puede ser administrado por vía intravenosa, intratecal, intra-articular, intravesical, intralesional o infundido en sitios quirúrgicos (Laniado-Laborín y Cabrales-Vargas, 2009). Las dosis de AmB para adultos en la infusión intravenosa son 0,5 mg/kg/día. Estas dosis pueden ser riesgosa, sobre todo en pacientes con enfermedades cardíacas, renales y hepáticas (Ourives-Neves *et al.*, 2011).

La AmB tiene la capacidad de unirse al colesterol de la membrana celular de las células de mamífero, de ahí su potencial toxicidad. Se supone que la base de la utilidad clínica de AmB es su mayor afinidad por las membranas que contienen ergosterol que para las membranas que contienen colesterol (Laniado-Laborín y Cabrales-Vargas, 2009). Se ha planteado, sin embargo, otros mecanismos como daño celular oxidativo, desestabilización de la membrana y la extracción de esterol conglomerado de polieno conocido como el modelo de la esponja (Mouri *et al.*, 2008; Gray *et al.*, 2012). La acción leishmanicida se

Revisión bibliográfica

cree que es debido a su capacidad para unirse al ergosterol, que es el esteroles más importante en *Leishmania* spp. y al colesterol de los macrófagos del huésped. En el caso de las células del hospedero, la AmB secuestra el colesterol de la membrana reduciendo su capacidad para interactuar con otros constituyentes de membrana, como los receptores. Como resultado existe una reducción en la capacidad de los promastigotes de *Leishmania* para interactuar con la célula hospedera (Paila *et al.*, 2010).

Las reacciones adversas más frecuentes son: fiebre, malestar, pérdida de peso, náuseas, vómitos, diarrea, cefalea. Puede provocar reacciones alérgicas, anemia normocítica normocrónica, agranulocitos, trombocitopenia, alteraciones en la coagulación, deterioro y anomalías de la función renal que pueden mejorar si se interrumpe el tratamiento o hacerse crónicos (Ghorbani y Farhoudi, 2018). Aunque la AmB es utilizada en lugares donde existe resistencia a los antimoniales no está exenta de problemas de resistencia de los parásitos, los efectos adversos antes mencionado y también son largos los períodos de tratamiento (Kumar *et al.*, 2017).

En los últimos años, con el fin de disminuir los efectos adversos provocados por la AmB, se han creado diferentes formulaciones lipídicas: AmB liposomal, complejo lipídico de AmB y suspensión coloidal de AmB. En algunos países estas formulaciones ya son utilizadas. La principal desventaja que presentan estas formulaciones de la AmB son el alto costo, teniendo en cuenta que los países más afectados con esta enfermedad están en vías de desarrollo (Botero *et al.*, 2014).

3.7.3 Pentamidina

La pentamidina es un derivado sintético de amidina. El descubrimiento de la actividad antiprotozoaria de las diamidinas es el resultado de la búsqueda de fármacos hipoglucemiantes que podrían comprometer el metabolismo energético del parásito (Ourives-Neves *et al.*, 2011). La pentamidina para el uso en humanos está disponible como la sal de isetionato (Pentacarinat®, Sanofi-Aventis). Las vías de administración pueden ser intravenosa o intramuscular 3-4 mg/Kg/día como dosis única durante 2-3 semanas (Bray, 2003).

El mecanismo de acción no está bien definido, se cree que actúa inhibiendo la síntesis de poliaminas, el enrollamiento de la doble hélice del ADN del kinetoplasto y un efecto sobre el potencial de membrana de la mitocondria (Grimaldi y Tesh, 1993). Produce efectos

Revisión bibliográfica

adversos como taquicardia, hipotensión, náuseas y vómitos. Se han reportado casos de pacientes con alteraciones en el metabolismo de la glucosa con hipoglucemias e hiperglicemias. Con menor frecuencia se observa deterioro de la función renal, así como leucocitopenia, trombocitopenia, elevación de aminotransferasas, fiebre e hipocalcemia. En el sitio de la inyección puede producir dolor, inflamación y abscesos estériles (Ourives-Neves *et al.*, 2011).

3.7.4 Miltefosina

El descubrimiento de la actividad antiprotozoaria y antineoplásica de la miltefosina data de la década de 1980. Aunque los primeros estudios fueron dirigidos a los pacientes con cáncer, su aplicación se discontinuó por los efectos gastrointestinales adversos. La necesidad de un tratamiento para la LV de fácil administración, la aparente disponibilidad en estudios previos y los resultados en modelos *in vitro* contra *L. donovani*, motivaron a los investigadores a ampliar su conocimiento (Sindermann y Engel, 2006).

La miltefosina es conocida también como hexadecilfosfocolina. Está disponible con la marca Impavido®, puede presentarse como un producto farmacéutico sólido de administración oral para humanos y Milteforan® como un producto farmacéutico líquido de administración oral para uso veterinario. Actualmente, la miltefosina es el único fármaco oral registrado para el tratamiento de la leishmaniasis. Existen diferencias para la dosificación en dependencia de la edad y el peso de los pacientes. En los adultos son 2,5 mg/kg/día durante 28 días (Sunyoto *et al.*, 2018).

Han surgido diferentes hipótesis para explicar el mecanismo de acción antileishmanial para la miltefosina. Sin embargo, todavía no hay pruebas definitivas para ninguna de esas hipótesis. Parece ser que la miltefosina tiene más de un sitio molecular de acción. Algunos estudios han verificado su influencia negativa sobre el metabolismo de lípidos, específicamente sobre los fosfolípidos, componentes de la membrana celular y el glicosilfosfatidilinositol, importante molécula del parásito implicada en la virulencia (Soto y Soto, 2006). Otro mecanismo estudiado ha sido la muerte celular por apoptosis en promastigotes de *L. donovani* (Paris *et al.*, 2004) y *L. amazonensis* (Marinho *et al.*, 2011).

Otros estudios sobre el papel de la miltefosina como antileishmanial se han dirigido a su efecto sobre los macrófagos como células hospederas. Se cree que tiene un efecto

Revisión bibliográfica

inmunomodulador. Un estudio realizado por Palic *et al.* (2019) comprobó el aumento del número de receptores de IFN- γ e IL-12 lo cual favorece el balance de las respuesta inmunológica favoreciendo una respuesta protectora Th1.

La desventaja de la miltefosina está relacionada con sus efectos sobre la mucosa del tracto gastrointestinal y su potencial teratogénico. Los efectos gastrointestinales observados son: falta de apetito, náuseas, vómitos, en algunos casos diarrea que disminuyen a la segunda o tercera semana de tratamiento. Otros efectos adversos están relacionados con el comprometimiento de riñones e hígado (Dorlo *et al.*, 2012). Este fármaco no causa cura parasitológica completa, por lo que después del tratamiento de los individuos infectados puede observarse el parásito. Esta persistencia favorece la transmisión (Kumar *et al.*, 2017).

3.8 Indazoles estudiados

La evaluación de los indazoles como agentes antiprotozoarios comenzó con el estudio de nuevos fármacos seguros y eficaces para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, fundamentalmente por la similitud química del anillo indazol con los fármacos de referencia utilizados en la clínica para la enfermedad de Chagas (Boiani *et al.*, 2009). Estos primeros compuestos, tuvieron como principio la unión del anillo indazol y el grupo 5-nitro debido a las propiedades antiprotozoarias previamente demostradas (Arán *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2009). En cuanto a los sustituyentes, tanto en los carbonos como en los nitrógenos, se diseñaron diferentes variantes.

El estudio realizado por Vega *et al.* (2012) se basó en evaluar la actividad de tres series (A, B y C) de las estructuras 5-nitroindazolin-3-ona: (i) disustituidas en las posiciones 1 y 2; (ii) sustituidas en la posición 2 con la 3-alcoxi-5-nitroindazol: y (iii) sustituidas en la posición 1 con la 3-alcoxi-5-nitroindazol. El resultado de la evaluación de estas series sobre *T. cruzi* permitió determinar los sustituyentes más activos, y a partir de estos potenciar su actividad: Serie A, los productos que provocaron una mayor inhibición del crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi* fueron aquellos cuyo sustituyente era el grupo bencilo (Bn); Serie B, el metilo (Me) fue el sustituyente que aportó mayor actividad tripanocida, pero la citotoxicidad evaluada en macrófagos murinos reveló una alta inhibición de la viabilidad celular, siendo el Bn el segundo sustituyente en aportar a la actividad antitripanosomal. Sin embargo, la Serie C no mostró actividad frente a *T. cruzi*.

Revisión bibliográfica

De estos resultados, entonces se derivó el diseño de cuatro series nuevas, que conforman los productos evaluados en el presente trabajo:

Serie A: Estructuras que se diseñaron a partir de la Serie A del estudio de Vega *et al.* (2012) con el Bn como sustituyente, dando lugar a 20 compuestos derivados del 1-sustituido 2-bencil-5-nitroindazolin-3-onas.

Serie B: Estructuras que se diseñaron a partir de la Serie B del estudio de Vega *et al.* (2012) con el Bn como sustituyente, dando lugar a 5 compuestos derivados de 3-alcoxi-2-bencil-2H-indazoles.

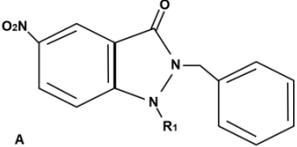
Serie C: Estructuras que se diseñaron a partir de la Serie B del estudio de Vega *et al.* (2012) con el Bn como sustituyente y una amina en el grupo alcoxi con el objetivo de aumentar su solubilidad, dando lugar a 3 compuestos derivados del 3-(aminoalcoxi)-5-nitroindazoles.

Serie D: Estructuras que se diseñaron a partir de los compuestos del estudio de Boiani *et al.* (2009) con el Bn como sustituyente, dando lugar a 13 compuestos derivados del 3-alcoxi-1-bencil-5-nitroindazoles.

De forma general, estas cuatro series dieron origen a 41 nuevos compuestos derivados con estructura general de tipo 5-nitroindazol (Vega *et al.*, 2012; Fonseca-Berzal *et al.*, 2016; Ibañez-Escribano, 2016; Fonseca-Berzal *et al.*, 2018). Los sustituyentes se muestran en la Tabla I.

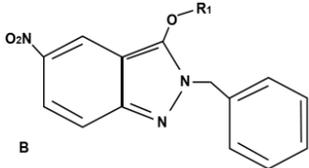
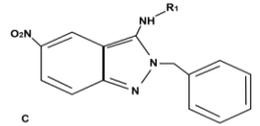
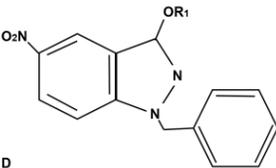
Revisión bibliográfica

Tabla I Fórmulas generales de las cuatro series de compuestos derivadas el 5-nitroindazol.

Estructura base	Producto	Sustituyente
 <p>A</p>	VA5-13L	CH ₃
	VATR1	(CH ₂) ₂ -CH ₃
	VATR3	(CH ₂) ₃ -CH ₃
	VATR69	CH ₂ -COOCH ₃
	VATR75	(CH ₂) ₂ OH
	VATR79	(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂
	VATR80	(CH ₂) ₂ -Pirrolidina
	VATR81	(CH ₂) ₂ -Piperidina
	VATR82	(CH ₂) ₂ -COOCH ₃
	VATR83	(CH ₂) ₃ - CONH ₂
	VATR87	(CH ₂) ₂ -Br
	VATR89	CH=CH ₂
	VATR92	CH ₂ - CH=CH ₂
	VATR93	CH ₂ -C ≡ CH
	VATR99	(CH ₂) ₃ -NH ₂
	VATR100	(CH ₂) ₃ -NHCH ₃
	VATR101	(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂
	VATR120	(CH ₂) ₂ NH ₂
	VATR131	(CH ₂) ₂ -OCOCH ₃
	VATR136	(CH ₂) ₂ OCH ₃

Revisión bibliográfica

Tabla I Continuación

Estructura base	Producto	Sustituyente
 <p>B</p>	VATR18	$(\text{CH}_2)_2\text{-CH}_3$
	VATR76	$(\text{CH}_2)_2\text{OH}$
	VATR88	$(\text{CH}_2)_2\text{-Br}$
	VATR97	$(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$
	VATR126	$(\text{CH}_2)_3\text{-OH}$
 <p>C</p>	VATR104	$(\text{CH}_2)_3\text{-OH}$
	VATR121	$(\text{CH}_2)_2\text{-OH}$
	VATR124	CH_3
 <p>D</p>	NV4	$(\text{CH}_2)_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$
	NV6	$(\text{CH}_2)_3\text{-N}(\text{CH}_3)_2$
	NV7	$(\text{CH}_2)_2\text{-Piperidina}$
	NV8	$(\text{CH}_2)_3\text{-Piperidina}$
	NV9	$(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$
	NV10	$(\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2$
	NV11	$(\text{CH}_2)_2\text{-Br}$
	NV12	$(\text{CH}_2)_5\text{-Br}$
	NV13	$(\text{CH}_2)_2\text{-NHCH}_3$
	NV14	$(\text{CH}_2)_5\text{-N}(\text{CH}_3)_2$
	NV15	$(\text{CH}_2)_5\text{-NHCH}_3$
	NV16	$(\text{CH}_2)_5\text{-Piperidina}$
	NV17	$(\text{CH}_2)_5\text{-NH}_2$

Revisión bibliográfica

Algunos de estos nuevos compuestos han demostrado previamente actividad antiprotozoaria. En particular, se demostró que inhibió el crecimiento de epimastigotes amastigotes de *T. cruzi*, así como de trofozoitos de *T. vaginalis* (Vega *et al.*, 2012; Fonseca-Berzal *et al.*, 2016; Ibañez-Escribano, 2016; Fonseca-Berzal *et al.*, 2018). En estos estudios además, desde el punto de vista farmacológico demostraron: (a) tener potencialidades similares a los fármacos de referencia, (b) ser activos sobre diferentes cepas en el caso de *T. cruzi*, y (c) similar actividad en aislamientos susceptibles y resistentes de *T. vaginalis*. En paralelo, de forma preliminar se observó que 10 de estos compuestos inhibieron el crecimiento de promastigotes de *L. amazonensis* (Fonseca-Berzal *et al.*, 2018).

Aunque el modo de acción de los indazoles no está completamente esclarecido, se han realizado diversos estudios en *T. cruzi*. En particular, en el análisis ultraestructural de este parásito se observaron algunas alteraciones que incluyeron: desprendimiento de la membrana plasmática y la envoltura nuclear, pérdida de integridad mitocondrial, aparición de una gran cantidad de vesículas intracelulares y perfiles de retículo endoplásmico que rodean a los orgánulos citoplasmáticos como la mitocondria. Por otra parte, los indazoles afectaron la función mitocondrial, reflejado por la inhibición en el consumo de oxígeno y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Fonseca-Berzal *et al.*, 2016). Otros estudios experimentales han sugerido que los cambios ultraestructurales observados en el parásito responden a la acción de radicales libres que reaccionan directamente con varias macromoléculas biológicas de importancia causando daños celulares y finalmente la muerte del parásito (Boiani *et al.*, 2009).

Por lo tanto, teniendo en cuenta que: (a) los 41 derivados nuevos de indazoles (Tabla I) han mostrado actividad antiprotozoaria en particular sobre *T. cruzi* y *T. vaginalis* (Fonseca-Berzal *et al.*, 2016; Ibañez-Escribano, 2016; Fonseca-Berzal *et al.*, 2018), (b) evidencias preliminares mostraron la actividad de algunos de estos compuestos sobre *L. amazonensis* (Fonseca-Berzal *et al.*, 2018), y (c) como mecanismo de acción se ha sugerido formación de radicales libres y actividad sobre la mitocondria que es considerada una diana terapéutica para el desarrollo de agentes antileishmanial (Fidalgo y Gille, 2011) sería interesante evaluar las potencialidades de estos compuestos sobre *L. amazonensis* en diferentes modelos *in vitro*, *in silico* e *in vivo*.

Materiales y métodos

4. Materiales y métodos

El presente trabajo es un estudio experimental, del cual se presenta el diagrama de flujo de trabajo general en la figura 7. Se llevó a cabo en la Dirección de Investigaciones del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, en colaboración con el Departamento de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK), en el período de septiembre de 2017 a julio de 2019. Para la realización de esta investigación se contó con los reactivos y equipamientos disponibles en el laboratorio de Parasitología del CBQ y de *Leishmania* del IPK. Los ensayos toxicológicos y de actividad antileishmanial *in vivo* se llevaron a cabo en los vivarios de ambas instituciones participantes, respectivamente. El protocolo experimental de la presente investigación fue previamente aprobado por la Comisión Científica Especializada de Parasitología (CCEP) del IPK, el Comité de Ética (CEI) del IPK (Código CEI-IPK 87-18) y el Consejo Científico del CBQ (9696-01-2018).

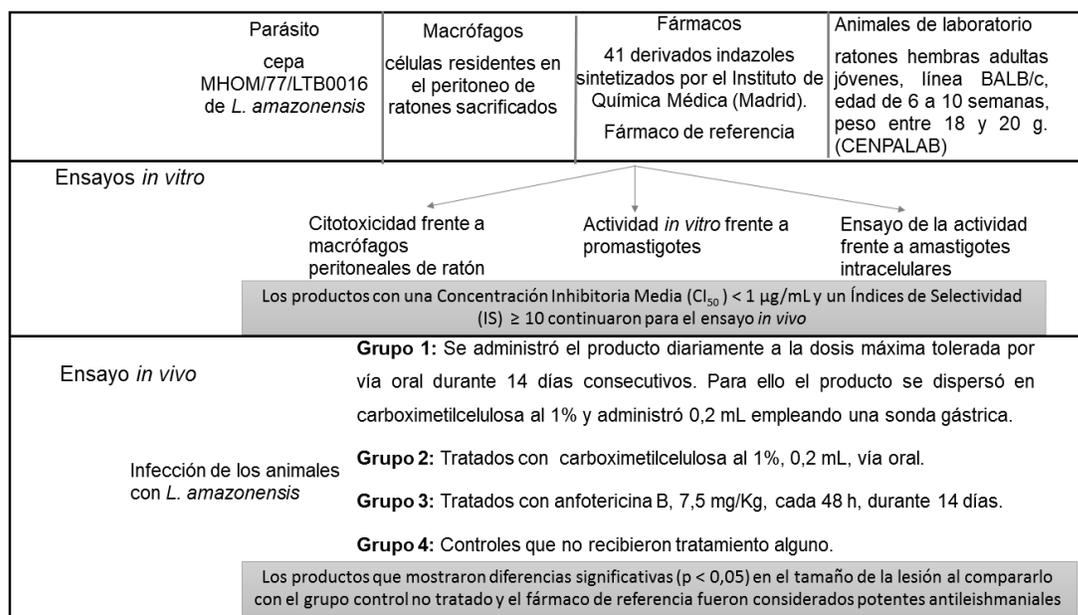


Figura 7 Diagrama de flujo general para la ejecución de los experimentos.

4.1 Parásito

Se empleó la cepa MHOM/BR/77/LTB0016 de *L. amazonensis* perteneciente a la colección de cepas del IPK. Los parásitos fueron obtenidos a partir de lesiones cutáneas

Materiales y métodos

de ratones BALB/c, previamente infectados, según la metodología empleada en el Laboratorio de *Leishmania* del Departamento de Parasitología del IPK (Monzote, 1999).

Los mismos se mantuvieron a 26°C en medio Schneider (SIGMA, St. Louis, MO, EUA), suplementado con antibióticos (penicilina sódica 200 UI/mL y estreptomina 200 µg/mL SIGMA, St. Louis, MO, EUA) y 10% de suero fetal bovino (SFB, SIGMA, St. Louis, MO, EUA) inactivado con calor (56°C, 30 min.). Los promastigotes, una vez aislados, se mantuvieron en fase de multiplicación exponencial mediante subcultivos sucesivos cada 3 ó 4 días hasta el momento de su uso. Para su empleo en los experimentos, los parásitos no excedieron los 10 subcultivos *in vitro*.

4.2 Animales de laboratorio

Para los experimentos se emplearon ratones hembras de la línea BALB/c, con una edad de 6 a 10 semanas y con peso entre 18 y 20 g suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Mayabeque, Cuba, con sus correspondientes certificados de calidad. Se mantuvieron bajo un régimen de 12 h - 12 h luz-oscuridad, temperatura ambiental de (20-25)°C, humedad relativa de (60-65)%, alimentación con pienso peletizado para roedores obtenido de CENPALAB y agua corriente de bebida esterilizada en autoclave. Tanto el agua como el alimento fueron suministrados para consumir libremente. Los animales se alojaron en cajas de poliacrilamida tipo T3, a razón de 10 ratones por caja, la cama fue bagazo de caña desmeollado y esterilizado por autoclave. Se siguió la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo (Relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, 22 de septiembre de 2010) para provocar el menor sufrimiento. Como se mencionó anteriormente el protocolo para el uso y cuidado de los animales fue previamente aprobado por el CEI-IPK y el Consejo Científico del CBQ.

4.3 Extracción de macrófagos peritoneales

Para obtener los macrófagos se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se extrajeron las células residentes en el peritoneo mediante un lavado con medio RPMI (siglas del inglés *Roswell Park Memorial Institute*), frío (4°C) suplementado con SFB al 10% y antibióticos (penicilina sódica 200 UI/mL y estreptomina 200 µg/mL). La concentración celular fue calculada a partir de conteos en cámara de Neubauer en un

Materiales y métodos

microscopio óptico (Motic, China) con objetivo de 40x y oculares de 10x (aumento 400x) y la suspensión fue utilizada según el ensayo a realizar como se describirá posteriormente.

4.4 Productos a evaluar

Se evaluaron 41 derivados indazoles procedentes de cuatro series de compuestos derivados del 5-nitroindazol, cuyas fórmulas generales se mostraron en la Tabla I. Los compuestos fueron sintetizados por el Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España, Madrid. Todos los productos tienen un nivel de pureza superior al 95%. Para los ensayos *in vitro* fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a una concentración inicial de 10 mg/mL y para los ensayos en animales fueron suspendidos en carboximetil-celulosa (CMC; BDH Chemicals, Poole, Inglaterra) al 1%. En ambos casos se conservó a 4°C hasta el momento de su utilización en cada experimento.

4.5 Fármacos de referencia

Como control positivo en todos los experimentos se utilizó la AmB desoxicolato de sodio (Empresa Laboratorio Farmacéutico “Julio Trigo López”, La Habana, Cuba). Se disolvió en agua destilada estéril a una concentración de 2 mg/mL y se conservó a 4°C hasta el momento de su utilización en cada experimento.

4.6 Selección de los derivados indazoles promisorios a partir de estudios *in vitro* de actividad antileishmanial y citotoxicidad.

4.6.1 Actividad *in vitro* de los derivados indazoles sobre promastigotes de *L. amazonensis*

Para este estudio se utilizaron placas de 96 pozos. Columna 1: 200 µL de medio de cultivo Schneider. Columna 2: 2 µL de furvina como control positivo adicional (CBA, Villa Clara, Cuba) + 198 µL de medio, se homogeneizó y desechó 80 µL. Columna 3: 2 µL de producto + 198 µL de medio, se homogeneizó. Columna 4-10: 120 µL de medio. Se realizaron diluciones seriadas desde 3-10 1/2,5 (80 µL) y se desecharon los 80 µL finales. Columna 11: 2 µL de DMSO y 198 µL de medio se homogeneizó y desecharon 80 µL. Columna 12: 120 µL de medio. Finalmente, se añadió en las columnas 2-12, 80 µL de cultivo de promastigotes de *L. amazonensis* a una concentración de 5×10^5 parásitos/mL. En cada placa, se evaluaron 2 productos (Filas A-D y E-H) con cuatro réplicas cada a

Materiales y métodos

partir de una concentración final de 60 µg/mL. Las placas se sellaron con Parafilm® (American National Can, Greenwich, Inglaterra) y se incubaron a 26°C durante 72 h. A este tiempo, todos los pozos fueron examinados en un microscopio de luz invertida (Olympus, Japón) con objetivo de 4x y oculares de 20x (aumento 80x) para la búsqueda de promastigotes móviles y se determinó la concentración parasiticida mínima (CPM), que no es más que la mínima concentración de producto que causa el 100% de inhibición del crecimiento de promastigotes de *L. amazonensis*.

Posteriormente, se añadió a cada pozo 20 µL de rezasurina (Resazurin sodium, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 3 µM y se incubó a 26°C. Este método se basa en el cambio de coloración de la rezasurina de azul a rosado, ya que existe una correlación directa entre la reducción del compuesto y el grado de proliferación de los organismos (Rolón *et al.*, 2006). La lectura se realizó a 540 nm de excitación y 590 nm de emisión, después de 8 h de incubación en un lector de placas de 96 pozos (SUMA®, Cuba). Se calcularon las medias de las florescencias para cada concentración. A partir de los valores de fluorescencia media y las concentraciones de producto correspondiente se realizó el ajuste no lineal al modelo de Emax sigmoidea (Bodley *et al.*, 1995) y se estimaron las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀). Los valores de CI₅₀ para cada producto fueron expresados como la media de al menos tres experimentos independientes con su desviación estándar (DE).

4.6.2 Citotoxicidad de los derivados indazoles sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

El indicador de citotoxicidad para los macrófagos peritoneales es la concentración citotóxica media (CC₅₀), que es aquella concentración estimada que reduce a la mitad el número de células viables en comparación con cultivos controles no tratados. La viabilidad celular fue medida también por el ensayo colorimétrico con rezasurina. Una vez colectados los macrófagos (Acápite 4.3) se determinó la concentración de la suspensión celular por conteo en cámara de Neubauer y se ajustó a 1-3 x 10⁵ macrófagos/mL. En placas de 96 pozos se distribuyó de la columna 2-12, 100 µL de la suspensión celular, se incubó durante 2 h a 33°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se añadió: Columna 1: 200 µL de medio RPMI suplementado con SFB y los antibióticos correspondientes; Columna 2: 198 µL de medio y 2 µL de furvina; Columna 3: 198 µL de medio y 2 µL de producto; Columna 4-10: 120 µL de medio. Se

Materiales y métodos

realizaron diluciones seriadas en las columnas 3-10 en la proporción de 1/2,5 (80 μ L de la solución concentrada) y se desecharon los 80 μ L finales. En la columna 11: 2 μ L de DMSO y 198 μ L de medio; mientras que en la columna 12: 200 μ L de medio. Finalmente, se repuso en las columnas 3-10 80 μ L de medio de tal forma que la máxima concentración evaluada del producto fue 300 μ g/mL. En cada placa se evaluaron 2 productos (Filas A-D y E-H) con cuatro réplicas cada uno. Se incubaron 72 h a 33°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, se añadió a cada pozo 20 μ L de resazurina y la lectura se realizó después de 16-18 h de incubación en las mismas condiciones en un lector de placas de 96 pozos. Se calculó la fluorescencia media para cada concentración y se ajustaron a un modelo de Emax sigmoidea para estimar las CC₅₀. Este procedimiento se repitió para cada producto al menos tres veces y los resultados son expresados como la media y su DE.

4.6.3 Actividad *in vitro* de los derivados de indazoles sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*

Se extrajeron macrófagos peritoneales y se determinó la concentración de células como se describió anteriormente. En placas de 24 pozos con lamínulas estériles en el fondo se distribuyó 1 mL de la suspensión celular. (10⁵ macrófagos/mL). Se incubó la placa a 33°C en 5% de CO₂ durante 2 h. Las células no adheridas fueron eliminadas y los macrófagos adheridos fueron infectados con promastigotes estacionarios de *L. amazonensis* a razón de cuatro parásitos por macrófago y el cultivo se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones. A las 4 h de incubación, los promastigotes libres fueron eliminados y se añadió 995 μ L de medio RPMI completo en todos los pozos. Se añadió 5 μ L de los compuestos previamente disueltos en DMSO para lograr una concentración final de 3 μ g/mL y otras 5 diluciones 1:2,5. Se incluyó además dos pozos con parásitos en la última columna que recibieron como tratamiento 5 μ L de DMSO. Los cultivos fueron incubados nuevamente durante 48 h bajo las mismas condiciones. Finalmente, el sobrenadante fue eliminado y la monocapa celular se fijó con metanol (Sigma, EUA) durante 10 min y se tiñó con Giemsa (Imefa, La Habana, Cuba) durante 15 min. El colorante fue eliminado, las lamínulas lavadas con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente. Mediante observación con microscopio óptico de campo brillante con objetivo de 100x y oculares de 10x (aumento 1000x) y empleando aceite de inmersión, se determinó el número de amastigotes presentes en 100 macrófagos. Se calculó el porcentaje de reducción de la infección (%RI) para cada concentración y se graficó contra las

Materiales y métodos

concentraciones evaluadas (Caio *et al.*, 1999, Plock *et al.*, 2001) para estimar las CI_{50} en amastigotes.

$$\%RI = 100 - \left[100 \frac{It}{Ic} \right]$$

It: promedio del número de amastigotes en los cultivos tratados.

Ic: promedio del número de amastigotes en los cultivos controles.

Se ajustaron linealmente los % RI contra el logaritmo de las concentraciones y se estimaron los valores de CI_{50} . Este procedimiento se llevó a cabo para cada uno de los productos evaluados con tres réplicas cada uno y los resultados fueron expresados como la media y su DE.

4.6.4 Índice de selectividad

Finalmente, para cada compuesto se determinó el Índice de Selectividad (IS) por la división de la CC_{50} para la célula hospedera entre la CI_{50} frente a los promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*.

4.6.5 Criterios de selección

Del estudio en promastigotes se seleccionaron los compuestos que presentaron una $CI_{50} \leq 1 \mu\text{g/mL}$ y un $IS \geq 10$ (Pink *et al.*, 2005) Solo los que cumplieron con este criterio pasaron al estudio en amastigotes intracelulares. Se seleccionaron como compuestos promisorios conocidos del inglés como '*hit*' aquellos compuestos que frente a amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* presentaron una $CI_{50} \leq 3 \mu\text{g/mL}$ y un $IS \geq 10$. Estos compuestos seleccionados, pasaron a los ensayos *in vivo*.

4.7 Selección de las cadenas laterales que aportan mayor actividad y selectividad de derivados indazoles a través de su relación estructura-actividad

El estudio de relación estructura-actividad (SAR, de sus siglas en inglés *Structure-Activity Relation*) fue realizado con los derivados de 5-nitroindazoles evaluados en esta tesis y a los que se les reportaron sus valores de CI_{50} frente a promastigotes y su citotoxicidad celular CC_{50} frente a macrófagos. Una descripción exhaustiva de las características estructurales que incrementan la actividad antileishmanial y disminuyan la citotoxicidad de las moléculas fue realizada utilizando el programa SARANEA (Hu y Bajorath, 2012), el cual es un programa libre que implementa una interface gráfica con el usuario para

Materiales y métodos

generar redes de similitud (por sus siglas en inglés, NSG) y así permite la exploración de muchos datos.

4.7.1 Colección de los datos

Se conformó una base de datos con los valores de CI_{50} , CC_{50} expresados en unidades de nanomolar (nM) reportados en esta tesis, así como las estructuras químicas de los derivaos de indazol estudiados. Los valores de deseabilidad individual para cada producto fue aquel que se correspondió con la CI_{50} y la CC_{50} previamente determinadas (dCI_{50} y dCC_{50} , respectivamente) y su deseabilidad global (DG). La función de deseabilidad fue propuesta por Harrington (1965) en 1965 para lograr la optimización de múltiples respuestas en una simple ecuación matemática.

4.7.2 Codificación estructural

La entrada del programa SARANEA usa representaciones tipo huellas moleculares (*fingerprint*). En este estudio, se utilizaron los MACCS (Molecular ACCess System) implementados en el programa CDK (Steinbeck *et al.*, 2003; Steinbeck *et al.*, 2006).

4.7.3 Redes de similitud estructural

La base de datos de los 5-nitroindazoles fue representada a través de redes de similitud estructural (NSG, de sus siglas en inglés NSG), mostrando todas las moléculas y sus relaciones de similitud. Las NSG son grafos en los cuales las moléculas son representadas por nodos y las aristas representan la similitud par a par. Solo los pares de moléculas que exceden un predefinido umbral de similitud son conectados por aristas. Para visualizar la distribución de la DG, los nodos son codificados de acuerdo a un espectro continuo de colores desde el rojo (alta selectividad) hasta verde (baja selectividad). El SARANEA brinda un valor de discontinuidad para cada compuesto, el cual codifica las características SAR.

En las NSG las combinaciones de nodos verdes unidos por una arista a nodos rojos indican presencia de compuestos llamados *activity cliff*. Estos compuestos son relevantes en los estudios SAR porque indican los pequeños cambios estructurales que modifican significativamente la selectividad. En SARANEA para que un par de compuestos esté conectado necesita exceder un predefinido valor de similitud dado por el coeficiente de Tanimoto (Tc) (Steinbeck *et al.*, 2003). En este trabajo, se utilizó un valor de Tc igual a 0,85 para explorar todas las características estructurales presentes en esta base de datos

Materiales y métodos

congenérica, obteniendo los sustituyentes que aportan mayor actividad y selectividad a la serie de compuestos derivados del indazol estudiados.

4.8 Evaluación del efecto de los derivados indazoles seleccionados en ratones BALB/c infectados experimentalmente con *L. amazonensis*.

Para la evaluación de los compuestos sobre la LC experimental en ratones BALB/c se seleccionaron compuestos representativos teniendo en cuenta: (a) la actividad de los compuestos sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* ($CI_{50} \leq 3 \mu\text{g/mL}$), (b) el IS (≥ 10), (c) que presentaran sustituyentes que aportan una mayor actividad y selectividad acorde los estudios *in silico*, y (d) la disponibilidad de los compuestos.

4.8.1 Determinación de Dosis Máxima Tolerada

El objetivo de estos ensayos fue determinar la máxima dosis (DMT) de cada producto que puede administrarse a los ratones durante 14 días consecutivos sin que se produzcan muertes ni pérdidas de peso superiores al 10% del peso inicial. Para ello, se formaron grupos de cinco ratones iniciándose la dosificación a 500 mg/kg. Los productos seleccionados se dispersaron en CMC al 1% y se administraron diariamente, por vía oral, durante 14 días, una vez al día. Los animales se observaron cada día para evaluar la aparición de signos de toxicidad y la ocurrencia de muertes. Asimismo, se pesaron a intervalos de 4 días para valorar el comportamiento del peso como indicador general de toxicidad. En los casos que ocurrieron muertes se detuvo el tratamiento y se recomenzó con otro grupo similar, pero se redujo la dosis a la mitad y se repitió el mismo esquema experimental.

4.8.2 Evaluación de los derivados indazoles seleccionados en ratones BALB/c infectados experimentalmente con *L. amazonensis*

Los ratones fueron infectados por vía subcutánea en los cojinetes plantares de la extremidad posterior derecha vista ventral con 5×10^6 promastigotes metacíclicos de *L. amazonensis* en un volumen de 50 μL de solución salina fisiológica estéril. A las 4 semanas post-infección (p.i.). Los animales se distribuyeron de forma aleatoria según el grupo de producto a administrar, momento en que se pesaron los ratones y midieron las lesiones. Para comprobar el proceso de aleatorización se compararon los pesos y las lesiones mediante análisis de varianza de un factor. Se consideraron homogéneos los grupos si los valores de p eran superiores a 0,1.

Materiales y métodos

Para la aplicación del tratamiento se conformaron los siguientes grupos:

Grupo 1: Se administró el producto diariamente a la DMT, por vía oral, una vez al día, durante 14 días consecutivos. El producto se dispersó en CMC al 1% y se administraron 0,2 mL empleando una sonda gástrica (Diehl *et al.*, 2001; OECD, 2001).

Grupo 2: Tratados con CMC al 1% que correspondió al grupo placebo, 0,2 mL; por vía oral, una vez al día, durante 14 días consecutivos empleando una sonda gástrica.

Grupo 3: Tratados con AmB: 7,5 mg/kg, una vez cada 48 h (para un total de 7 dosis) durante 14 días, vía intraperitoneal.

Grupo 4: Controles que no recibieron tratamiento alguno. Los ratones se mantuvieron en condiciones similares a los demás. Se examinaron al inicio de la serie experimental y los días paralelos para confirmar que mantenían una conducta activa, acicalamiento, ingestión de agua y alimentos y socialización, indicativos de normalidad.

A partir del inicio del tratamiento (p.t), se observaron diariamente los animales y se registraron las muertes en caso de que ocurrieran. Se determinó el peso corporal y se midió el diámetro dorso-plantar de las lesiones cada 7 días desde el T0 (tiempo 0 p.t. que se correspondía con las 4 semanas p.i.) hasta 3 semanas p.t. (T3), momento que finalizó el experimento. Para ello se empleó un cutímetro (Kroëplin, Längenmesstechnik, error de medición 0,05 mm).

Tres días después de concluir el tratamiento se determinó la carga parasitaria (CP) por el método de microtitulación en placa de 96 pozos descrito por (Buffet *et al.*, 1995). Para ello, tres animales de cada grupo fueron sacrificados por dislocación cervical y se tomaron muestras de la lesión. Las muestras fueron pesadas y se trituraron en una placa Petri con un fragmento de gasa estéril y 4 mL de medio Schneider suplementado con SFB 10% y antibióticos. Las muestras fueron trituradas y seguidamente, se tomaron 20 µL de la suspensión tisular y se transfirieron a la primera fila (dos pozos por muestra) de una placa de 96 pozos que contenía 180 µL de medio de cultivo. A partir de estos pozos, se realizaron 7 diluciones seriadas 1:4. A continuación, la placa se selló con Parafilm®, se incubó a 26°C y pasados 7 días se examinó visualmente en busca de promastigotes móviles utilizando un microscopio de luz invertida a 400x.

La presencia de promastigotes móviles se evaluó en cada pozo. El título final se determinó por la última dilución de la muestra en la que existían promastigotes móviles. La CP por gramo de tejido fue calculada con la siguiente fórmula:

Materiales y métodos

$$CP\left(\frac{\text{parásitos}}{g}\right) = \frac{2000 \times 4^{d-1}}{p}$$

Donde p es el peso (g) de la muestra y d la mayor dilución en que se observó crecimiento de promastigotes. Se consideró el primer pozo de la placa como $d=1$ (Buffet *et al.*, 1995).

4.9 Análisis estadístico

Los datos se almacenaron en bases de datos en Excel. Para comparar el tamaño de la lesión se realizó análisis de varianza (ANOVA) para mediciones repetidas. En caso de encontrar diferencias en el ANOVA, se realizó una prueba de diferencias significativas mínimas de Fisher. Para comparar la carga de parásitos en las lesiones se empleó la prueba de Kruskal-Wallis y la de comparaciones múltiples para distribuciones libres en caso de encontrar diferencias en la prueba anterior. Todos los análisis se realizaron con el programa STATISTICA, Versión 10 y se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

4.10 Consideraciones éticas

El protocolo fue analizado y aprobado por el CCEP, el CEI y el Consejo Científico del CBQ como se ha mencionado con anterioridad. Los estudios con animales de experimentación se llevaron a cabo luego de la aprobación del protocolo por parte del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, IPK, Cuba). Los animales procedieron del CENPALAB y se trataron según recomienda la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo (Relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, 22 de septiembre de 2010) para el trabajo con animales de experimentación. Durante los experimentos se siguieron todas las directrices como se mencionó anteriormente, que se requieren para tratar de forma compasiva los animales, empleando la menor cantidad de ellos posible y provocando el menor sufrimiento.

Se potenció la confidencialidad y seguridad de los resultados manteniendo el acceso limitado a los mismos por el personal previamente autorizado.

5. Resultados

5.1 Selección de los derivados indazoles promisorios a partir de estudios *in vitro* de actividad antileishmanial y citotoxicidad.

5.1.1 Actividad *in vitro* de los derivados indazoles sobre a promastigotes de *L. amazonensis*.

Los 41 derivados del 5-nitroindazol se evaluaron sobre promastigotes de *L. amazonensis* (Tabla II). De forma general, los compuestos mostraron valores elevados de CPM, aunque en la mayoría (37 compuestos) se observaron valores de $CI_{50} \leq 1 \mu\text{g/mL}$, o sea, en muchos casos, son inhibidores del crecimiento, pero no tienen marcada actividad parasiticida.

5.1.2 Citotoxicidad de los derivados indazoles sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

El estudio de citotoxicidad se realizó a los 41 compuestos (Tabla II). De forma general, todos los compuestos causaron citotoxicidad a las concentraciones evaluadas. En la serie A, se encontraron compuestos que mostraron valores de $CC_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$ (VAYR69, VATR79, VATR80, VATR99 y VATR120). Las series B y C tuvieron valores de $CC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$. En el caso de la serie D los valores, en su mayoría, son superiores a $10 \mu\text{g/mL}$.

Con los resultados de la actividad antileishmanial en promastigotes y la citotoxicidad en macrófagos, se determinó el IS (Tabla II). De los 41 indazoles evaluados, 16 presentaron valores de $CI_{50} \leq 1 \mu\text{g/mL}$ y con $IS \geq 10$, fundamentalmente de las Series A y D. Estos compuestos seleccionados continuaron al ensayo *in vitro* en amastigotes de *L. amazonensis*.

Resultados

Tabla II Actividad antileishmanial y citotoxicidad de derivados del 5-nitroindazol sobre promastigotes de *L. amazonensis* y macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.

Serie	Producto	CPM ($\mu\text{g/mL}$)	CI ₅₀ \pm DE ($\mu\text{g/mL}$)	CC ₅₀ \pm DE ($\mu\text{g/mL}$)	IS
A	VA5-13L	60 – 24	0,7 \pm 0,1	1,1 \pm 0,3	2
	VATR1	60 – 24	0,2 \pm 0,1	1,5 \pm 0,5	5
	VATR3	60 – 24	0,2 \pm 0,1	1,7 \pm 0,5	8
	VATR69	> 60	0,2 \pm 0,1	58,4 \pm 7,5	295
	VATR75	> 60	0,4 \pm 0,2	5,0 \pm 2,9	13
	VATR79	> 60	13,0 \pm 0,4	67,0 \pm 5,2	5
	VATR80	> 60	0,3 \pm 0,2	62,2 \pm 7,8	195
	VATR81	60	10,1 \pm 2,9	4,6 \pm 2,2	1
	VATR82	> 60	0,2 \pm 0,1	2,6 \pm 1,9	12
	VATR83	> 60	0,3 \pm 0,2	2,9 \pm 1,3	11
	VATR87	> 60	0,5 \pm 0,2	1,4 \pm 0,6	3
	VATR89	> 60	0,3 \pm 0,1	1,5 \pm 0,2	5
	VATR92	> 60	0,8 \pm 0,7	1,3 \pm 0,03	2
	VATR93	> 60	0,5 \pm 0,4	1,3 \pm 0,1	5
	VATR99	120	0,5 \pm 0,1	38,3 \pm 1,8	35
	VATR100	56 – 22	0,9 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1	1
	VATR101	88 – 35	5,0 \pm 0,3	1,9 \pm 1,2	0,4
	VATR120	60 – 24	0,3 \pm 0,1	43,6 \pm 5,1	100
VATR131	> 60	0,8 \pm 0,3	143,0 \pm 48,8	189	
VATR136	> 60	0,6 \pm 0,3	1,6 \pm 0,3	3	
B	VATR18	> 60	0,3 \pm 0,1	1,4 \pm 0,3	5
	VATR76	> 60	0,5 \pm 0,3	2,5 \pm 0,8	5
	VATR88	> 60	0,2 \pm 0,1	1,0 \pm 0,5	4
	VATR97	120	11,9 \pm 1,4	3,9 \pm 1,2	0,3
	VATR126	> 60	0,9 \pm 0,5	0,6 \pm 0,2	1
C	VATR104	> 60	0,4 \pm 0,2	1,4 \pm 0,4	3
	VATR121	> 60	0,5 \pm 0,4	1,4 \pm 0,4	3
	VATR124	> 60	0,5 \pm 0,4	2,1 \pm 0,8	4

Tabla II Continuación

D	NV4	60	0,2 ± 0,04	25,3 ± 3,4	168
	NV6	61 - 4	0,2 ± 0,1	12,1 ± 2,7	72
	NV7	55 - 11	0,017 ± 0,01	11,1 ± 2,9	620
	NV8	53 - 3	0,003 ± 0,001	10,4 ± 2,2	331
	NV9	24 - 10	0,3 ± 0,1	17,4 ± 3,8	59
	NV10	60 - 24	0,3 ± 0,04	16,3 ± 6,2	47
	NV11	> 60	0,7 ± 0,4	1,7 ± 0,4	2
	NV12	> 60	0,8 ± 0,4	1,7 ± 1,5	1
	NV13	60 - 24	0,3 ± 0,1	22,3 ± 3,4	75
	NV14	60 - 24	0,2 ± 0,1	1,1 ± 0,3	5
	NV15	24 - 10	0,6 ± 0,4	2,4 ± 1,1	3
	NV16	60	0,2 ± 0,1	9,7 ± 3,3	44
	NV17	24 - 10	0,4 ± 0,1	3,0 ± 1,2	8
AmB	0,3	0,03 ± 0,01	5,8 ± 0,5	193	

Los valores se expresan como la media ± DE de las CI_{50} y CC_{50} , respectivamente. CPM: Concentración Parasitocida Mínima; es la concentración que causa el 100% de inhibición de crecimiento de promastigotes de *L. amazonensis*.

CI_{50} : Concentración Inhibitoria Media; es la concentración que reduce en un 50% la proliferación de los promastigotes de *L. amazonensis*. Es el resultado de al menos tres experimentos.

DE: Desviación estándar.

CC_{50} : Concentración Citotóxica Media, es la concentración que causa la lisis del 50% de los macrófagos peritoneales de ratón BALB/c. Es el resultado de promediar al menos tres experimentos.

IS: Índice de Selectividad para promastigotes ^a calculados como $IS = CC_{50} / CI_{50}$

En negrita se resaltaron los productos seleccionados como activos ($CI_{50} \leq 1 \mu\text{g/mL}$) y selectivos ($IS \geq 10$).

5.1.3 Actividad *in vitro* de los derivados indazoles sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*.

El ensayo para determinar la actividad de los productos en amastigotes intracelulares se realizó solo con los 16 compuestos que mostraron actividad antileishmanial en

Resultados

promastigotes y una selectividad adecuada, seleccionados previamente como se expuso en el acápite 5.1.2 (Tabla II). De estos compuestos, 10 cumplieron con el criterio establecido ($CI_{50} \leq 3 \mu\text{g/mL}$ y un $IS \geq 10$); siendo 4 compuestos de la Serie A y 6 de la Serie D (Tabla III).

Tabla III Actividad *in vitro* de los productos derivados del 5-nitroindazol frente a amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*.

Serie	Producto	$CI_{50} + DE$ ($\mu\text{g/mL}$)	$CI_{50} + DE$ (μM)	IS
A	VATR69	> 3,41	> 10	>17
	VATR75	2,84 \pm 0,37	9,09 \pm 1,19	2
	VATR80	2,85 \pm 0,13	6,25 \pm 0,30	19
	VATR82	0,29 \pm 0,15	0,85 \pm 0,40	9
	VATR83	1,49 \pm 0,84	4,22 \pm 2,38	2
	VATR99	2,89 \pm 1,05	7,95 \pm 2,90	15
	VATR120	2,98 \pm 0,73	8,53 \pm 2,09	16
	VATR131	0,16 \pm 0,001	0,46 \pm 0,01	881
D	NV4	> 3,76	> 10	7
	NV6	0,17 \pm 0,02	0,43 \pm 0,049	72
	NV7	2,43 \pm 0,26	5,61 \pm 0,69	4
	NV8	0,45 \pm 0,21	1,00 \pm 0,48	23
	NV9	0,41 \pm 0,36	1,13 \pm 0,98	42
	NV10	1,51 \pm 0,32	4,35 \pm 0,9	11
	NV13	2,05 \pm 0,19	5,66 \pm 0,53	11
	NV16	0,075 \pm 0,02	0,17 \pm 0,042	124
AmB		0,034 \pm 0,006	0,31 \pm 0,006	172

Los valores se expresan como la media \pm la DE de las medias.

CI_{50} : Concentración Inhibitoria Media; es la concentración que reduce en un 50% la infección en macrófagos infectados con amastigotes de *L. amazonensis*. Es el resultado de al menos tres experimentos.

DE: Desviación Estándar.

IS: Índice de Selectividad para amastigotes, calculados como $IS = CC_{50}$ (reportada en la Tabla II, acápite 5.1.2) / CI_{50} (amastigotes).

Resultados

En negrita los productos seleccionados como activos ($CI_{50} \leq 3 \mu\text{g/mL}$) y selectivos ($IS \geq 10$).

5.2 Selección de las cadenas laterales que aportan mayor actividad y selectividad de derivados indazoles a través de su relación estructura-actividad

Del programa SARANEA, se obtuvo una red de similitud conectada con dos clústeres claramente identificados (Figura 8). Un primer agrupamiento representado fundamentalmente por los 1-sustituido 2-bencil-5-nitroindazolin-3-onas (Serie A) y un segundo agrupamiento por los 3-alcoxi-1-bencil-5-nitroindazoles (Serie D). En el primer grupo predomina la presencia de nodos verdes y amarillos de tamaño pequeño lo cual indica que ese conjunto de compuestos constituye un espacio estructural pobre para la extracción de información SAR relevante. Por este motivo, no continuaron los posteriores análisis. Un espacio diferente caracteriza el segundo grupo el cual está formado por la presencia de nodos verdes y rojos de tamaño grande. Esto indica que ofrece una fuente rica para extraer relevante información estructural, ya que pequeñas modificaciones en la estructura implican grandes cambios en la actividad o selectividad. Esto último esta dado porque existe un mayor número de pares de *selectivity cliff*.

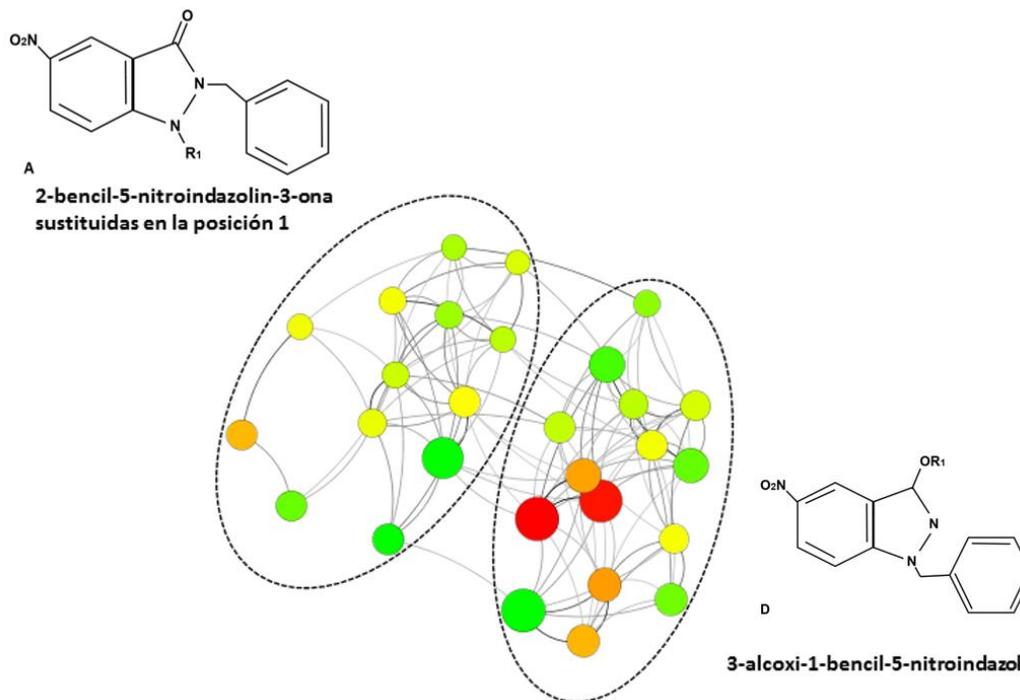


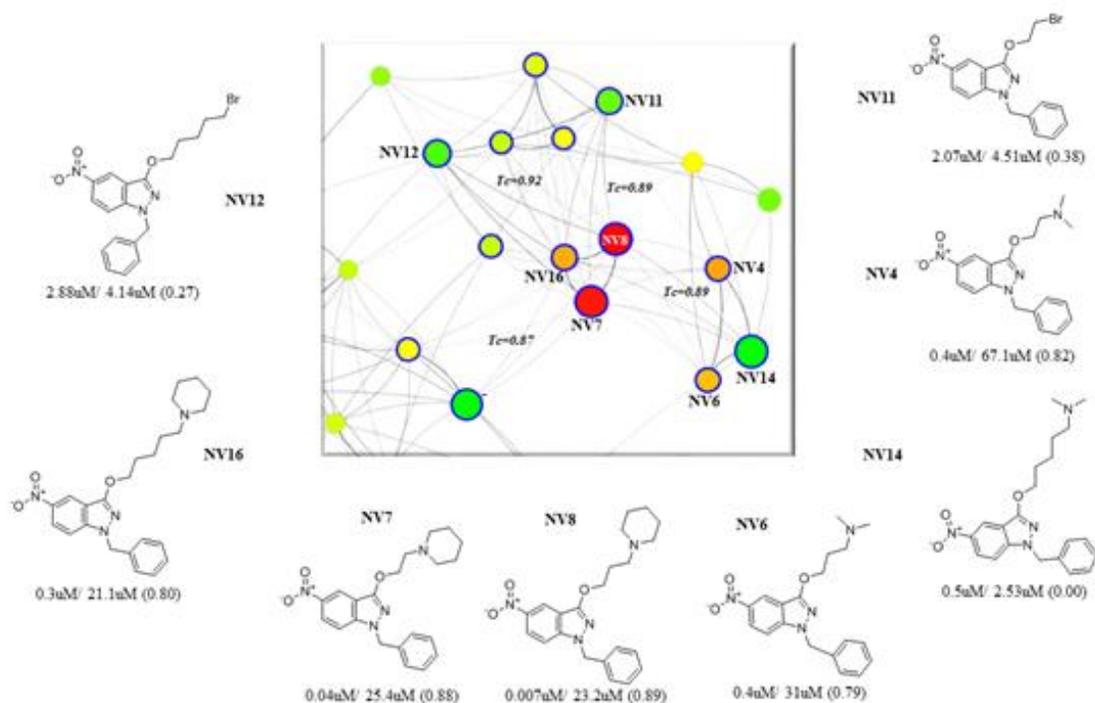
Figura 8 NSG generada con el programa SARANEA para agrupar los derivados de 5-nitroindazoles usando un $T_c = 0,85$. Esta NSG representa dos grupos de compuestos que

Resultados

codifican dos tipos de comportamiento SAR. Los nodos representan compuestos conectados por aristas si ellos comparten una similitud 2D por encima de un umbral predefinido. El color y el tamaño del nodo refleja el valor de la DG, por ejemplo, nodo rojo y de tamaño grande implica alta eficacia y seguridad del compuesto.

Un análisis más exhaustivo del grupo de la Serie D indica la existencia de un gran número de *selectivity cliff* y por lo tanto de importantes modificaciones estructurales que dominan el SAR de esta familia de compuestos. Estos pares pueden ser fácilmente identificados a través de un análisis exhaustivo de la red de similitud presentada en la figura 9. El par de *selectivity cliff* más relevante de este clúster es el constituido por el compuesto 1-bencil-5-nitro-3-[3-(piperidin-1-yl) propoxi]-1H-indazol (NV8), el más potente y seguro de las estructuras presentes en esta base de datos y su análogo 1-benzyl-5-nitro-3-[5-(n,n-dimethylamino)pentoxy]-1H-indazol (NV14). El valor de DG de NV8 es 0,89; mientras que el correspondiente valor de DG de NV14 es cero. Esto refleja una completa pérdida de selectividad del derivado NV14, aunque su potencia se conserva ($CI_{50} = 0,2 \mu\text{g/mL}$).

Otro par de *selectivity cliff* formados por los nodos NV11 y NV12 con el nodo NV8 evidencian que la introducción de los sustituyentes bromoalquílicos en la posición 3-O de la serie analizada inducen una pérdida importante de la selectividad debido a una disminución de la potencia e incremento de la citotoxicidad.



Resultados

Figura 9 Red de similitud para explorar los pares de compuestos de los *selectivity cliff*.

Finalmente, es importante analizar el papel de los sustituyentes alquilamino en la posición 3-O del núcleo analizado, a través del uso de un árbol SAR generado por el programa SARANEA y mostrado en la figura 10. Este árbol parte del nodo NV14 que representa a un compuesto con sustituyente dimetilaminopentoxo en la posición 3 del núcleo 1-bencil-5-nitroindazol. Este sustituyente es una amina terciaria unida a la posición 3-O del núcleo analizado mediante un grupo pentil. Cuando este sustituyente se modifica a una amina secundaria (nodo NV15, DG = 0,41) y luego a una amina primaria (nodo NV17, DG = 0,58) manteniendo el grupo pentil como puente entre el N amínico y el 3-O, se aprecia un incremento ligero en la DG. Sin embargo, este comportamiento es contrario cuando se sustituye en las estructuras anteriores, el grupo pentil por el grupo etil o propil. O sea, se obtiene un incremento en la selectividad cuando se sustituye en la posición 3-O del núcleo analizado una amina primaria (NV10, NV19), secundaria (NV13) y luego terciaria (NV6).

En resumen, se logran mejores valores de selectividad cuando las estructuras poseen sustituyentes tipo aminas terciarias, pero con grupos alquílicos pequeños. En el caso de los sustituyentes tipo aminas terciarias cíclicas (NV16, NV7 y NV8) también se cumple lo anterior y además logran los mejores valores de selectividad de la base de datos analizada.

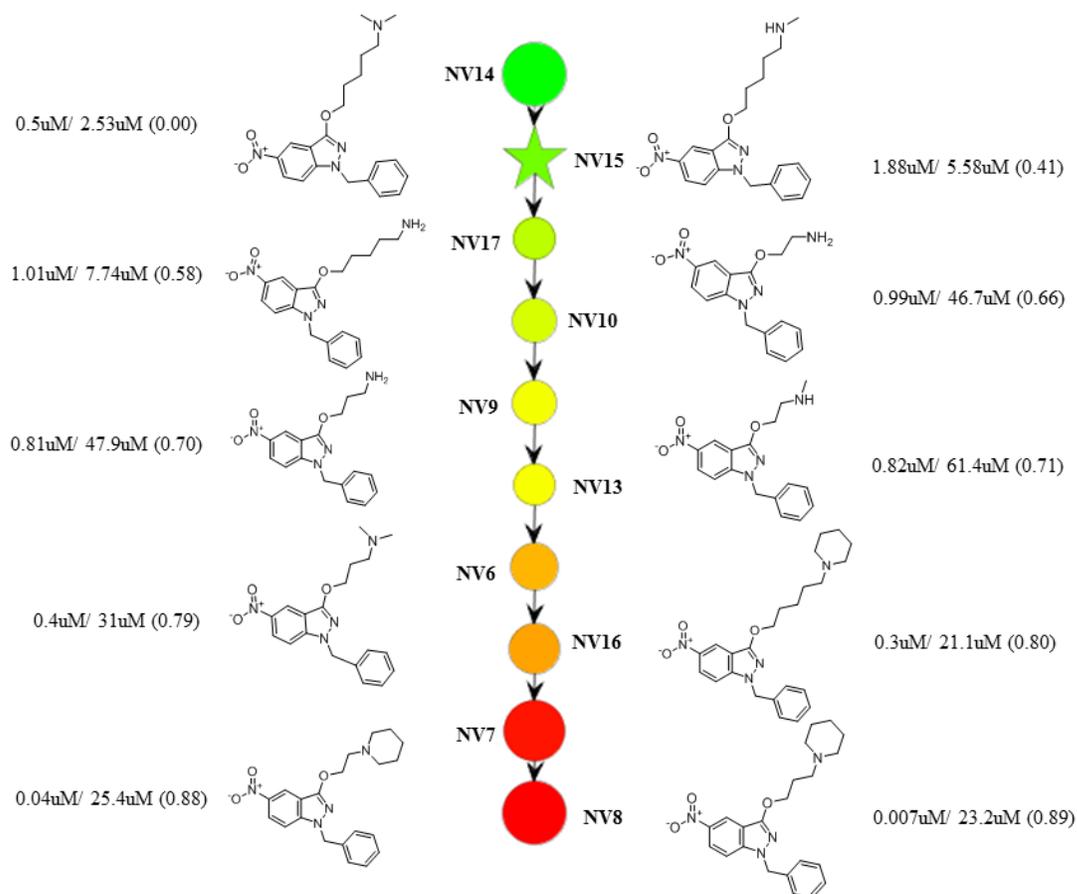


Figura 10 Árbol SAR generado para los derivados de 3-alcóxi-1-bencil-5-nitroindazol y su selectividad. Los nodos verdes/amarillos-naranja-rojo representan compuestos de baja/alta deseabilidad global. Además, son mostradas las estructuras moleculares junto con sus valores de IC₅₀/CC₅₀ (DG).

5.3 Evaluación del efecto de los derivados indazoles seleccionados en ratones BALB/c infectados experimentalmente con *L. amazonensis*.

Finalmente, para el estudio *in vivo* se seleccionaron 3 compuestos (VATR99, VATR120 y NV13) que previamente cumplieron los criterios en los estudios *in vitro* de actividad / selectividad y que contenían los sustituyentes de mayor actividad obtenidas del estudio *in silico*. La efectividad de los compuestos fue evaluada en el modelo *in vivo* de LC en ratones BALB/c a través del tamaño de la lesión y la determinación de la CP en la región infectada.

Resultados

5.3.1 Determinación de Dosis Máxima Tolerada

De forma general, en el examen clínico se observó disnea y convulsiones a la dosis de 500 mg/kg de los tres compuestos analizados. En todos los casos, fue necesario reducir las dosis a 250 mg/kg, por observarse muertes en más del 10% de los animales durante las primeras horas post-tratamiento. Adicionalmente, para NV13 hubo una reducción de 125 mg/kg por observarse estas mismas manifestaciones toxicas a dosis de 250 mg/kg.

Por lo tanto, se seleccionó una DMT de 250 mg/kg de los compuestos VATR99 y VATR120; mientras que fue de 125 mg/kg para el NV13. A estas concentraciones, durante 14 días de administración de cada compuesto, se observó una disminución del peso en los ratones los días 4, 8, 12 y 16 de iniciada la dosificación con los productos VATR99 y NV13 pero sin diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto al grupo control y sin llegar a disminuir un 10% del peso inicial. Estos animales a los 20 días de iniciado el tratamiento mostraron un ligero aumento en el peso corporal. En los animales dosificados con el producto VATR120, no se observaron pérdidas de peso a estas dosis (Tabla IV).

Tabla IV: Variación en el peso corporal (%) de los ratones BALB/c durante el estudio de Dosis Máxima Tolerada

Grupos de estudio	Días evaluados post-tratamiento					
	0	4	8	12	16	20
VATR99	0,0	- 3,4	- 2,9	- 1,1	- 0,4	1,0
VATR120	0,0	4,8	4,5	6,2	6,5	5,8
NV13	0,0	- 2,6	- 2,4	- 0,8	- 0,3	1,8
CMC	0,0	0,6	- 0,8	3,5	4,8	6,9
Control	0,0	1,7	6,4	6,8	8,3	12,2

VATR99: 250 mg/kg en un volumen de 0,2 mL durante 14 días consecutivos, vía oral

VATR120: 250 mg/kg en un volumen de 0,2 mL durante 14 días consecutivos, vía oral

NV13: 125 mg/kg en un volumen de 0,2 mL durante 14 días consecutivos, vía oral

CMC 1%: 0,2 mL durante 14 días consecutivos, vía oral

Control no recibieron tratamiento alguno

Los valores positivos significan un incremento en el peso corporal de los animales respecto al inicio del tratamiento, los valores negativos, por el contrario, indican pérdida de peso con respecto al inicio del tratamiento

Resultados

5.3.2 Evaluación de los derivados indazoles seleccionados en ratones BALB/c infectados experimentalmente con *L. amazonensis*

Durante todo el experimento, no se observaron muertes ni signos clínicos de toxicidad en ninguno de los grupos en estudio. Se determinó el peso corporal cada 7 días desde la cuarta semana p.i. hasta la semana 3 p.t. En el grupo control y el tratado con CMC al 1% dicha variable se mantuvo estable durante todo el tratamiento. Los grupos tratados con los compuestos en estudio VATR99 y VATR120 por vía oral, no demostraron ser tóxicos para los animales a las dosis seleccionadas, los animales mantuvieron el peso o mostraron una ligera tendencia a aumentar. En el caso del NV13, se observó una disminución en el peso de los animales durante el tratamiento pero no fue superior al 10% respecto al inicio del tratamiento y una vez concluido la tendencia de esta variable fue aumentar (Tabla V). El peso corporal de los animales tratados con AmB disminuyó en las primeras semanas p.t. Sin embargo, durante las semanas posteriores al tratamiento el peso se restableció hasta valores comparables al de los controles no tratados.

Tabla V: Variación en el peso corporal (%) de los ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis* durante el estudio con los indazoles seleccionados.

Grupos de estudio	Días evaluados post-tratamiento			
	0	7	14	21
VATR99	0,0	- 0,6	1,4	3,6
VATR120	0,0	- 1,3	- 1,1	1,9
NV13	0,0	- 7,4	- 7,0	- 2,5
CMC 1%	0,0	1,1	- 1,0	0,2
Control	0,0	- 2,1	- 0,1	1,3
AmB	0,0	- 11,5	- 16,2	-1,7

VATR99: 250 mg/kg en un volumen de 0,2 mL durante 14 días consecutivos, vía oral

VATR120: 250 mg/kg en un volumen de 0,2 mL durante 14 días consecutivos, vía oral

NV13: 125 mg/kg en un volumen de 0,2 mL durante 14 días consecutivos, vía oral
AmB: 7,5 mg/kg, cada 48 h, durante 14 días consecutivos, vía intraperitoneal

CMC 1%: 0,2 mL durante 14 días consecutivos, vía oral

Control no recibieron tratamiento alguno

Resultados

Los valores positivos significan un incremento en el peso corporal de los animales respecto al inicio del tratamiento, los valores negativos, por el contrario, indican pérdida de peso con respecto al inicio del tratamiento.

Los días que se midió el peso corporal de los animales se determinó, además, el diámetro dorso-plantar de las lesiones. Los animales que recibieron CMC al 1% y los que no recibieron tratamiento alguno, tuvieron un aumento progresivo en el tamaño de la lesión durante todo el experimento de forma similar ($p > 0,05$). Solo los animales que recibieron tratamiento con el NV13 tuvieron una disminución en el tamaño de la lesión con respecto al grupo control los días 7 y 14 p.t. ($p < 0,05$) y comparable ($p > 0,05$) al efecto logrado por la AmB a los 7 días posteriores al inicio del tratamiento. A los 14 días tiende a aumentar pero sigue siendo menor el tamaño de la lesión ($p < 0,05$) que el grupo tratados con CMC. Una vez concluido el tratamiento las lesiones aumentan como en el resto de los grupos. En el caso de los grupos a los cuales se les administró los compuestos VATR99 y VATR120, no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a los grupos controles (negativo y placebo). En contraste, las lesiones en los ratones tratados con AmB mostraron una reducción significativa con respecto al resto de los grupos ($p < 0,001$) durante todo el período de evaluación (Figura 11).

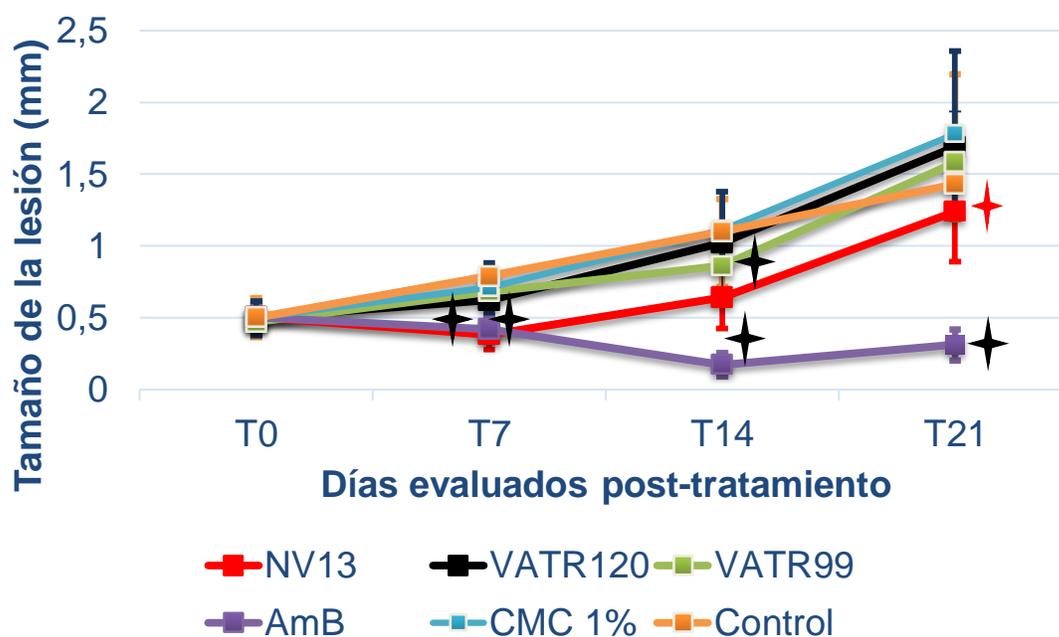


Figura 11 Variación en el tamaño de la lesión de los ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis* y tratados. NV13: 125 mg/kg en un volumen de 0,2 mL durante 14 días

Resultados

consecutivos, vía oral. VATR120: 250 mg/kg en un volumen de 0,2 mL durante 14 días consecutivos, vía oral. VATR99: 250 mg/kg en un volumen de 0,2 mL durante 14 días consecutivos, vía oral. AmB: 7,5 mg/kg, cada 48 h, durante 14 días consecutivos, vía intraperitoneal. CMC 1%: en un volumen de 0,2 mL durante 14 días consecutivos, vía oral. Control: no recibieron tratamiento alguno.

✦ Muestra diferencias estadísticas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control no tratado

✦ Muestra diferencias estadísticas ($p < 0,05$) con respecto al grupo tratado con CMC al 1%

La carga parasitaria no demostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los animales que recibieron tratamiento con los diferentes derivados del indazol y la del grupo control. Sin embargo, pudieron observarse diferencias significativas ($p < 0,05$) del grupo tratado con AmB y el resto de los grupos experimentales (Figura 12).

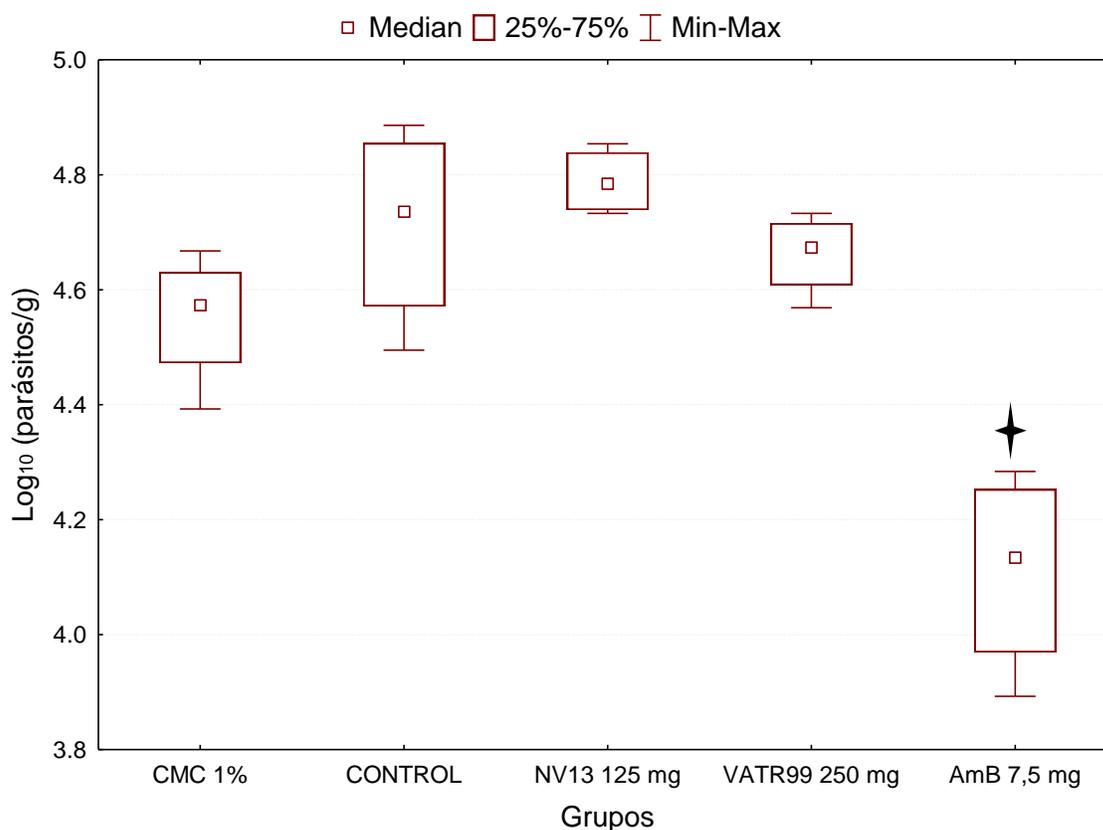


Figura 12 Efecto del tratamiento sobre la carga parasitaria en los ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis* después de concluido el tratamiento. NV13: 125 mg/kg en un volumen de 0,2 mL durante 14 días consecutivos, vía oral. VATR99: 250 mg/kg en un volumen de 0,2 mL durante 14 días consecutivos, vía oral. AmB: 7,5 mg/kg, cada 48 h,

Resultados

durante 14 días consecutivos, vía intraperitoneal. CMC 1%: en un volumen de 0,2 mL durante 14 días consecutivos, vía oral. Control: no recibieron tratamiento alguno.

✦ Muestra diferencias estadísticas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control no tratado

6. Discusión

En la actualidad, no hay una vacuna disponible ni preparaciones profilácticas contra la leishmaniasis; mientras que el control a vectores y reservorios es insatisfactorio en áreas endémicas. Por tanto, el control de esta enfermedad depende únicamente de la quimioterapia. Sin embargo, los fármacos disponibles presentan alto costo, toxicidad y la eficacia depende de la especie de *Leishmania*. En este sentido, constituye una necesidad el desarrollo de nuevos agentes antileishmaniales eficientes y más seguros (Soyer, 2019). Una de las estrategias recomendadas ha sido el diseño de nuevas moléculas a través de la química combinatoria (Monzote, 2011).

Uno de los farmacóforos utilizados para la obtención de diversos compuestos con un amplio rango de actividades biológica ha sido el grupo indazol, del cual se ha reportado sus potencialidades como anti-inflamatorio, anti-arrítmico, antitumoral, antifúngico, antibacteriano, antiviral y antiparasitario (Vidyacharan *et al.*, 2016; Shinde *et al.*, 2016; Behrouz, 2017; Jayanthi y Rajakumar, 2017; Lavrard y Popowycz, 2018). Frente a *Leishmania*, diversos derivados del indazol han sido estudiados, como son los derivados del 3-alcoxi-5-nitroindazol (Martín-Montes *et al.*, 2019), óxidos de 3-ciano-2-(4-yodofenil)-indazol (Gerpe *et al.*, 2006) e híbridos con el indazol / pirona (El Ghozlani *et al.*, 2018).

En particular, la evaluación frente a protozoos parásitos de los derivados de indazoles utilizados en este estudio, comenzó con la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para la enfermedad de Chagas y la trichomoniasis (Vega *et al.*, 2012; Fonseca-Berzal *et al.*, 2016; Ibañez-Escribano, 2016; Fonseca-Berzal *et al.*, 2018). El mecanismo de acción probablemente es similar al del nifurtimox y benznidazol, basado en la creación de especies reactivas e inhibición mitocondrial (Boiani *et al.*, 2009; Fonseca-Berzal *et al.*, 2016). Considerando el grado de parentesco entre *T. cruzi* y *Leishmania*, que pertenecen a la misma familia Trypanosomatidae, pudiera proponerse similar acción frente a ambos protozoos parásitos. Por estos motivos, en el presente trabajo nos propusimos evaluar las potencialidades de derivados indazoles frente a *L. amazonensis* en diferentes modelos *in vitro*, *in silico* e *in vivo*.

Discusión

6.1 Selección de los derivados indazoles promisorios a partir de estudios *in vitro* de actividad antileishmanial y citotoxicidad.

Para la selección de compuestos promisorios con actividad antileishmanial, el primer paso de evaluación se basa en los modelos *in vitro*, incluyendo promastigotes y amastigotes (Caridha *et al.*, 2019).

En este estudio, de un total de 41 compuestos, 37 (90%) tuvieron actividad antileishmanial sobre promastigotes de *L. amazonensis*, con valores de $CI_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ acorde a los criterios internacionales expuestos para la selección de candidatos con actividad antileishmanial (Pink *et al.*, 2005). Entre las 4 series estudiadas, puede destacarse en orden de actividad la Serie D ($CI_{50} = 0,003 - 0,81 \mu\text{g/mL}$) > Serie C ($CI_{50} = 0,44 - 0,52 \mu\text{g/mL}$) > Serie B ($CI_{50} = 0,2 - 11,9 \mu\text{g/mL}$) > Serie A ($CI_{50} = 0,2 - 13 \mu\text{g/mL}$).

Previamente, (Fonseca-Berzal *et al.*, 2018) reportó como estudio preliminar, que 10 de los compuestos estudiados mostraron una potente actividad antileishmanial frente a esta especie, también con valores de $CI_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$. Estos resultados resaltan las potencialidades de los derivados estudiados ya que compuestos diseñados por otros autores con igual grupo farmacóforo no han mostrado una potente actividad. En este sentido, podemos citar el estudio de (Marín *et al.*, 2015) frente a especies de *L. infantum* y *L. braziliensis*, donde derivados del 5-nitroindazol mostraron CI_{50} superiores a los indazoles estudiados, con valores de CI_{50} entre 11 - 52 μM .

En paralelo, los resultados de actividad sobre promastigotes de los derivados de indazol fueron comparados con los obtenidos para la AmB ($CI_{50} = 0,03 \mu\text{g/mL}$), lo cual concuerda con lo reportado en la literatura ($CI_{50} = 0,01 \mu\text{g/mL}$) para esta especie de *Leishmania* (Rocha *et al.*, 2019). En general, los compuestos estudiados presentaron un valor superior de CI_{50} , excepto para los productos NV7 y NV8 que mostraron una actividad similar a la AmB ($CI_{50} = 0,017 \mu\text{g/mL}$ (0,04 μM) y 0,003 $\mu\text{g/mL}$ (0,007 μM), respectivamente). Estos compuestos también son más activos que otros fármacos utilizados en la clínica, como es la pentamidina ($CI_{50} = 10,2 \mu\text{g/mL}$; (Dutra *et al.*, 2014) y la miltefosina ($CI_{50} = 20,7 \mu\text{g/mL}$; (Scariot *et al.*, 2017).

Otros compuestos sintéticos con diferente grupo farmacóforo seleccionados como promisorios han mostrado un amplio rango de inhibición frente a *L. amazonensis*. Por ejemplo, el ravuconazol, un derivado del triazol (Teixeira de Macedo *et al.*, 2018) y el tamoxifeno, un trifeniletileno (Reimão y Uliana, 2018), han causado una CI_{50} de 0,96 μM y 3,62 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Discusión

Los estudios en promastigotes presentan la ventaja que crecen en cantidades suficientes para evaluar un alto número de compuestos (Caridha *et al.*, 2019). Sin embargo, el parásito *Leishmania* una vez que infecta al humano es fagocitado principalmente por macrófagos; aunque también puede sobrevivir en el interior de neutrófilos y células dendríticas (Whyte y Zufferey, 2017). Por lo tanto, se necesita saber el índice de seguridad a partir de la CC_{50} sobre macrófagos, la cual constituye la célula diana del parásito (Grogl *et al.*, 2013; Caridha *et al.*, 2019). En este sentido, se evidenció que en general todos los productos causaron una $CC_{50} < 150 \mu\text{g/mL}$. Al analizar la selectividad, se pueden mencionar en el siguiente orden: Serie D (IS = 1 - 620) > Serie A (IS = 0,4 - 295) > Serie C (IS = 3 - 4) > Serie D (IS = 0,3 - 5). Como puede apreciarse, existió un alto contraste en la citotoxicidad de los compuestos de las Series B y C frente a macrófagos peritoneales, con valores de IS inferiores a 10.

En los estudios de citotoxicidad, se pueden realizar ensayos con células procedentes de líneas continuas o de cultivos primarios. Las ventajas que presentan las líneas celulares continuas son la homogeneidad y caracterización de la muestra, además de obtener un gran volumen en poco tiempo. Los productos en estudio, han sido previamente evaluados en líneas celulares de macrófagos murinos J774 (Vega *et al.*, 2012), fibroblastos murinos L929 (Fonseca-Berzal *et al.*, 2016; Fonseca-Berzal *et al.*, 2018) y células Vero (Ibañez-Escribano, 2016). En estos estudios de forma general los compuestos dieron una menor citotoxicidad, con valores de $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$.

En la presente investigación, se utilizaron células de cultivos primarios, los cuales presentan la ventaja de mayor similitud a lo que ocurre en la naturaleza, siendo las células de preferencia por el parásito *Leishmania* en la naturaleza (O'keffe *et al.*, 2019). Reproducir con la mayor similitud lo que ocurre en el ambiente nos da una idea más certera de los ensayos que realizamos. Las diferencias en la toxicidad de las diferentes líneas celulares pudiera deberse a que las líneas celulares continuas están en constante crecimiento y un producto pudiera tener efecto sobre la célula pero no inhibir el crecimiento. En los macrófagos peritoneales como no tienen capacidad de división, el efecto en las células repercute no solo en la viabilidad sino en el número (Sifontes, 2017).

Los macrófagos son el tipo celular predominante dentro de las lesiones cutáneas causadas por *Leishmania* y puede infectarse con algunos o varias cientos de parásitos, dependiendo de la especie involucrada. En la naturaleza, los macrófagos se infectan con los promastigotes inoculados por el vector transmisor y son inicialmente internalizados por

Discusión

neutrófilos, posteriormente son fagocitados por los macrófagos y una vez en el fagolisosoma maduro se diferencian a la forma de amastigote (Colmenares *et al.*, 2004). Un producto eficaz debe ser capaz de traspasar la membrana citoplasmática del macrófago sin causar daño y actuar sobre el parásito. Los estudios preliminares en promastigotes de *L. amazonensis* nos brindan información de la posible relación estructura-actividad de los compuestos evaluados y pudieran constituir un primer tamizaje para descartar aquellos que no tienen actividad. Sin embargo, los ensayos que brindan mayor información son los que emplean amastigotes intracelulares, que son la forma infectante en el hospedero mamífero (O'keffe *et al.*, 2019).

Por lo tanto, teniendo en cuenta los valores de CI_{50} sobre promastigotes de *L. amazonensis* y el IS, se seleccionaron 16 compuestos para realizar el estudio frente a amastigotes intracelulares, ya que correspondieron a una $CI_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ y un $IS > 10$ (Pink *et al.*, 2005).

De los 16 derivados del 5-nitroindazol evaluados sobre amastigotes intracelulares, 14 (87,5%) mostraron CI_{50} inferiores a $3 \mu\text{g/mL}$. La serie de los NV que contenían los compuestos más activos en promastigotes igualmente en el ensayo con amastigotes resultó ser más activa con valores inferiores a $1 \mu\text{g/mL}$. No se comportaron de la misma manera los productos NV6, NV7 y NV8. El NV8 en promastigotes resultó ser el compuesto más activo, pero en amastigotes el NV6 mostró una $CI_{50} = 0,17 \mu\text{g/mL}$ y un $IS = 72$. Estos resultados pudieran explicarse por la diferencia en el sustituyente de la cadena lateral. En el caso del NV8, tiene una piperidina y una amina heterocíclica saturada, de mayor volumen que la amina terciaria que es el sustituyente en el NV6 y por tanto mejores posibilidades de rotación e internalización en la membrana.

Estos compuestos no han sido evaluados previamente sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania*. Sin embargo, los valores de CI_{50} son similares o inferiores a diferentes productos sintéticos que se estudian en la actualidad como nuevas alternativas antileishmaniales. Por ejemplo, la quinolina ha sido un compuesto con mucha utilidad en el mundo farmacéutico, sus derivados se han utilizado como antisépticos, antibióticos y contra la malaria. En recientes estudios realizado por Coimbra *et al.* (2016) comprobó su actividad antileishmanial frente a amastigotes de *L. amazonensis* ($CI_{50} = 0,07 \mu\text{g/mL}$). Otro estudio realizado por Ribeiro *et al.* (2016) comprobó la actividad de derivados de aminoquinoleínas frente a amastigotes de *L. amazonensis*. Los resultados de la CI_{50} de sus compuestos más activos estuvieron entre $8,1 \mu\text{M}$ y $15,6 \mu\text{M}$. El ravuconazol evaluado

Discusión

frente a amastigotes mostró a las 48 h de expuesto a los parásitos una CI_{50} de 5,11 μM (Teixeira de Macedo *et al.*, 2018). Por otra parte, Oliveira *et al.* (2018) realizó el diseño, la síntesis y comprobó la actividad antileishmanial de derivados de la oxoquinolina, con valores de CI_{50} entre 0,7 – 2 μM .

Si comparamos los valores de la AmB con nuestros productos, ninguno tiene valores inferiores al fármaco de referencia pero sí hay varios productos con un IS superior a 10. Este resultado debe tomarse en cuenta conociendo que los productos con estos valores tienen una CC_{50} superior a la AmB la cual es citotóxica y constituye una de sus principales desventajas que limita su utilización en la clínica (Oliveira *et al.*, 2011). En el estudio realizado por Rocha *et al.* (2019) igualmente comparó el resultado de sus productos frente a la AmB como fármaco de referencia, obteniendo una CI_{50} de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ frente a amastigotes de *L. amazonensis*.

Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos estudiados han sido evaluados frente a *T. cruzi* y *T. vaginalis*. En el estudio realizado por Fonseca-Berzal *et al.* (2016), de 38 compuestos evaluados 40% (15) mostraron actividad antitripanocida (1,58 – 13,29 μM) inferiores al Benznidazol® (22,73 μM) utilizado como fármaco de referencia. Posteriormente, este mismo autor (Fonseca-Berzal *et al.*, 2018) evaluó nuevos derivados indazoles a partir de las cabezas de serie de las estructuras A, B y C. De 19 compuestos evaluados frente a epimastigotes de *T. cruzi*, 63% (12) mostraron actividad (0,24 – 23,36 μM), aunque inferior al fármaco de referencia (Benznidazol® 26,55 μM). De los compuestos evaluados sobre trofozoitos de *T. vaginalis* por Fonseca-Berzal *et al.* (2016), ninguno mostró actividad inferior al metronidazol utilizado como fármaco de referencia (0,83 $\mu\text{g/mL}$).

6.2 Selección de las cadenas laterales que aportan mayor actividad y selectividad de derivados indazoles a través de su relación estructura-actividad.

Los estudios computacionales o *in silico* permiten evaluar las propiedades similares de compuestos. En el presente trabajo, se analizaron los sustituyentes de los derivados indazoles con el objetivo de obtener una comparación rápida de la influencia de los mismos en la actividad/selectividad *in vitro* de los compuestos estudiados. En particular, el programa SARANEA permite la exploración interactiva de información de relación estructura-actividad (SAR) y relación estructura-selectividad (SSR). Por lo tanto, integra varias funciones de análisis SAR y SSR mediante una estructura de datos de similitud y agrupa los compuestos por redes para una mejor visualización.

Discusión

En este estudio, se utilizaron árboles de selectividad, resúmenes de bioactividad de compuestos clave y marcadores de compuestos bioactivos que tienen efectos secundarios potenciales. Estas importantes herramientas nos permitieron determinar los sustituyentes de mayor actividad e identificar los ligeros cambios que pudieran o no afectar su potencia (Loukine *et al.*, 2010).

Los estudios SAR han sido de amplia utilidad en el diseño de diversos compuestos en series evaluadas sobre *Leishmania* (Sifontes, 2017, Zhu *et al.*, 2015, Das, 2017).

6.3 Evaluación de los derivados indazoles seleccionados en ratones BALB/c infectados experimentalmente con *L. amazonensis*

De los 16 compuestos que fueron activos y selectivos en los estudios *in vitro*, solo tres compuestos fueron seleccionados para realizar la evaluación en el modelo murino de LC en ratones BALB/c: dos productos de la Serie A (VATR99 y VART120) y un producto de la Serie D (NV13). Estos compuestos se escogieron teniendo en cuenta: (a) representan las dos series que mostraron mayor actividad tanto en promastigotes como amastigotes de *L. amazonensis* (Serie A y D), (b) sus cadenas lateras están sustituidas por aminas primarias y secundarias que resultaron ser en el estudio *in silico* los sustituyentes de mayor actividad y selectividad, (c) se contaba con la cantidad suficiente de los productos para estudiar y aplicar altas dosis, y (d) podrían utilizarse como prueba de principio que los derivados de indazoles activos y selectivos en los estudios *in vitro* también podrían ser efectivos en el modelo *in vivo*, que justificara la utilización de un número mayor de animales para estudiar el resto de los compuestos.

En este caso, la vía de administración utilizada fue la oral debido a: (a) algunos de estos indazoles han sido administrados por vía oral en modelos de tripanosomiasis (Boiani *et al.*, 2009) y trichomoniasis (Ibañez-Escribano, 2016) en ratones BALB/c, con buenos resultados en cuanto a efectividad relacionada por la disminución de la carga parasitaria, (b) entre las características deseadas de un nuevo agente antileishmanial se encuentra que pueda ser administrado por vía oral teniendo en cuenta que la mayoría de los pacientes viven en zonas rurales y son pobres, y los fármacos disponibles requieren, en su mayoría, hospitalización (Oliveira *et al.*, 2011), y (c) constituye una vía de administración sistémica que no solo puede contribuir al control de la infección, sino que también puede prevenir la aparición de lesiones metastásicas (Caridha *et al.*, 2019). En la literatura científica se pueden apreciar varios estudios donde se utiliza la vía oral para

Discusión

evaluar la eficacia de productos sobre la LC experimental en ratones BALB/c con resultados satisfactorios.

Antes de realizar el estudio farmacológico de los compuestos seleccionados sobre la LC experimental en ratones BALB/c, se seleccionaron las DMT para cada compuesto según la OECD. En este caso, se pudo conocer la dosis máxima de cada compuesto que es capaz de tolerar un animal sin causar muertes ni reducción de más del 10% del peso inicial. Con este ensayo se garantiza la distribución sistémica del producto sin llegar a afectar la sobrevivencia del animal ni que sufra a causa de la toxicidad del compuesto (OECD, 2001).

En esta investigación, los animales del grupo control mostraron un aumento del tamaño de la lesión de forma continua y progresiva, resultado que se esperaba teniendo en cuenta la susceptibilidad de esta línea de ratones a la infección (Mears *et al.*, 2015). Es importante destacar también que los ratones tratados con el placebo, también mostraron un desarrollo similar ($p > 0,05$) al de los controles durante todo el experimento.

De los tres compuestos derivados del indazol evaluados, se observó que el NV13 fue capaz de controlar el desarrollo de la lesión con respecto al control y al placebo ($p < 0,05$) durante el día 7 y 14 p.t; mientras que al día 21 p.t. aún mantenía diferencias respecto al placebo ($p < 0,05$). Sin embargo, los animales tratados con los compuestos VATR99 y VATR120 no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto a los tratados con el NV13, placebo o controles, lo cual pudiera estar relacionado con la diferencia en la cabeza de serie. Además, pudiera existir alguna relación con respecto a los sustituyentes; los compuestos de la Serie A (VATR99, VATR120) tienen aminas laterales primarias y el de la Serie D (NV13) tiene una amina secundaria que pudiera influir positivamente en la efectividad de este compuesto.

Los resultados obtenidos para los compuestos de la Serie A (VATR) en el ensayo *in vivo* no se esperaban si tomamos en cuenta que mostraron los menores valores de CI_{50} ($< 5 \mu\text{g/mL}$) tanto sobre a promastigotes y amastigotes. Sin embargo, al observar las CPM de los derivados indazoles, en su mayoría, son inhibidores del crecimiento y no parasiticidas. Estos resultados pudieran explicar el por qué una vez eliminada la presión de los productos las lesiones tienden a aumentar y la carga parasitaria aumenta al realizarse dos semanas después de concluido el tratamiento.

Discusión

Por otra parte, el control de la lesión fue similar ($p > 0,05$) entre el grupo de animales tratados con el NV13 y la AmB durante los primeros 7 y 14 días p.t., aunque de forma general la AmB mostró una mayor efectividad al finalizar el experimento (21 días p.t.) respecto al grupo tratado con el NV13, placebo y control no tratado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos al calcular la carga parasitaria, donde solo la AmB mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al resto de los grupos tratados y controles. Además, el control del tamaño de la lesión por el NV13 pudiera deberse no solo a la actividad antileishmanial directa, como se demostró en los experimentos *in vitro*, sino también pudiera ejercer algún efecto indirecto, como es la estimulación del sistema inmunológico o efecto anti-inflamatorio. En este trabajo, no se realizaron estudios que permitan demostrar estas propiedades para el compuesto NV13. Sin embargo, se ha reportado que los indazoles tienen propiedad antiinflamatoria (Kaur *et al.*, 2011) y antioxidante (Shakil *et al.*, 2013).

Los modelos de LC en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis* para evaluar la eficacia de diferentes tratamientos contra esta parasitosis ha sido ampliamente utilizado (Paladi *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2019; Carregal *et al.*, 2019). No obstante, es conocido que los ratones BALB/c son altamente susceptibles a esta parasitosis y desarrolla lesiones severas que conlleva a la rápida progresión de la enfermedad y puede llegar a causar la muerte del animal (Monzote, 1999; Loría-Cervera y Narvaez, 2014; Mears *et al.*, 2015). Por estos motivos, los resultados prometedores en los estudios *in vivo* observados para el NV13, podrían tenerse en cuenta con el objetivo que sea utilizado como cabeza de serie para futuros compuestos con mayor actividad/selectividad *in vitro* y efectividad *in vivo*, a partir de la optimización de la estructura teniendo en cuenta su relación con la función biológica observada.

6.4 Discusión general

Los resultados observados a nivel celular tanto sobre *Leishmania* que los efectos citotóxicos sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c demuestran las potencialidades de los derivados de indazol para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas antileishmaniales. En particular, la Serie D se destacó por presentar la mayor actividad y selectividad, lo cual fue a su vez observado en los estudios *in silico*. En particular el NV13, mostró eficacia al administrarlo por vía oral en el modelo de LC experimental en ratones BALB/c. La vía oral presenta la ventaja de ser una vía sistémica que pudiera contribuir al control de la progresión de la enfermedad por vías indirectas, aunque también podrían evaluarse otras vías de administración como la tópica. Estudios

Discusión

futuros de toxicología, farmacocinética y de formulación con el NV13, podrían ser explorados para el desarrollo de un nuevo agente antileishmanial.

No obstante, otros de los compuestos que mostraron actividad antileishmanial y selectividad *in vitro* podrían ser evaluados también en el modelo de LC experimental, así como sobre otros protozoos parásitos de importancia médica.

En conclusión, los estudios realizados en este trabajo en modelos *in vitro*, *in silico* e *in vivo*, demostraron las potencialidades de los derivados del indazol como grupo farmacóforo frente la leishmaniasis.

7. Conclusiones

1. De los derivados indazoles evaluados, 16 fueron activos y selectivos sobre promastigotes de *L. amazonensis*; mientras que 10 fueron seleccionados como promisorios sobre amastigotes intracelulares. Esto permitió proponer 4 y 6 compuestos de las Series A y D, respectivamente, como productos potenciales con actividad antileishmanial en modelos *in vitro* que pueden ser considerados como hit para el desarrollo de agentes con actividad antileishmanial.
2. Los compuestos activos y selectivos fueron distribuidos en dos grupos, siendo la pirrolidina y las aminas primarias, secundarias y terciarias los sustituyentes que aportaron la mayor potencia, lo cual permitirá el diseño de nuevos compuestos derivados del 5-nitroindazol.
3. En el estudio *in vivo*, solo el NV13 mostró efecto sobre la leishmaniasis cutánea experimental en ratones BALB/c, lo que permite proponerlo como cabeza de serie para el diseño de nuevos compuestos con mayor eficacia.

Recomendaciones

8. Recomendaciones

1. Evaluar en el modelo de leishmaniasis cutánea experimental en ratones BALB/c el resto de los compuestos seleccionados en los experimentos *in vitro* acorde a su actividad y selectividad.
2. Evaluar los compuestos promisorios en la leishmaniasis cutánea experimental utilizando otras vías de administración.
3. Diseñar y evaluar nuevos compuestos derivados del 5-nitroindazol a partir del NV13.
4. Estudiar la actividad de estos compuestos sobre otros protozoos de importancia médica como *Plasmodium falciparum*, *Giardia lamblia* y *Toxoplasma gondii*.

9. Bibliografía

- ADAMS, E.;JACQUET, D.;SCHOONE, G.;GIDWANI, K.;BOELAERT, M. y CUNNINGHAM, J. 2012. Leishmaniasis direct agglutination test: using pictorials as training materials to reduce inter-reader variability and improve accuracy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6, 1946.
- AKHOUNDI, M.;DOWNING, T.;VOTÝPKA, J.;KUHL, K.;LUKE, J.;CANNET, A.;RAVEL, C.;MARTY, P.;DELAUNAY, P.;KASBARI, M.;GRANOUILAC, B.;GRADONI, L. y SERENO, D. 2017. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 57, 1-29.
- AKHOUNDI, M.;KUHL, K.;CANNET, A.;VOTÝPKA, J.;MARTY, P.;DELAUNAY, P. y SERENO, D. 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10, 1-40.
- ALEMAYEHU, B. y ALEMAYEHU, M. 2017. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Health Science Journal*, 11, 1-6.
- ALVAR, J.;VÉLEZ, I.;BERN, C.;HERRERO, M.;DESJEUX, P.;CANO, J.;JANNIN, J.;DEN BOER, M. y TEAM;, T. W. L. C. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 7, 1-12.
- ARÁN, V.;OCHOA, C.;BOIANI, L.;BUCCINO, P.;CERECETTO, H.;GERPE, A.;GONZÁLEZ, M.;MONTERO, D.;NOGAL, J.;GÓMEZ-BARRIO, A.;AZQUETA, A.;LÓPEZ DE CERAÍN, A.;O, P. y CASTELLANO, E. 2005. Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 3197-207.
- BEHROUZ, S. 2017. Highly efficient one-pot three component synthesis of 2H-indazoles by consecutive condensation, C-N and N-N bond formations using Cu/Aminoclay/reduced grapheme oxide nanohybrid. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 54, 1863-71.
- BENSOUSSAN, E.;NASEREDDIN, A.;JONAS, F.;SCHNUR, L. y JAFFE, C. 2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 1435-9.
- BODLEY, A.;MCGARRY, M. y SHAPIRO, T. 1995. Drug cytotoxicity assay for African *Trypanosomes* and *Leishmania* Species. *The Journal of Infectious Diseases*, 1157-9.
- BOIANI, L.;GERPE, A.;ARÁN, V.;TORRES DE ORTIZ, S.;SERNA, E.;VERA DE BILBAO, N.;SANABRIA, L.;YALUFF, G.;NAKAYAMA, H.;ROJAS DE ARIAS, A.;MAYA, J.;MORELLO, J.;CERECETTO, H. y GONZÁLEZ, M. 2009. *In vitro* and *in vivo* antitrypanosomatid activity of 5-nitroindazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 1034-40.
- BOTERO, M.;PUENTES-HERRERA, M. y CORTÉS, J. 2014. Formas lipídicas de anfotericina. *Revista Chilena de Infectología*, 31, 518-27.
- BRAY, P. 2003. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in parasitology*, 19, 232-9.
- BRAY, R. 1974. Leishmania. *Annual Review of Microbiology*, 28, 189-217.
- BUFFET, P.;SULAHIAN, A.;GARIN, Y. y NASSAU-DEROUIN, F. 1995. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 39, 2167-8.
- CAIO, T.;LIMA, M.;KAPLAN, M.;NAZARETH, M. y ROSSI-BERGMANN, B. 1999. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 1234-41.
- CARIDHA, D.;VESELY, B.;VAN BOCXLAER, K.;ARANA, B.;MOWBRAY, C.;RAFATI, S.;ULIANA, S.;REGUERA, R.;KREISHMAN-DEITRICK, M.;SCIOTTI, R.;BUFFET, P. y CROFT, S. 2019. Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for

Bibliografía

- cutaneous leishmaniasis. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 19.
- CARREGAL, V.;LANZA, J.;SOUZA, D.;ISLAM, A.;DEMICHELI, C.;FUJIWARA, R.;RIVAS, L. y FRÉZARD, F. 2019. Combination oral therapy against *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice using nanoassemblies made from amphiphilic antimony(V) complex incorporating miltefosine. *Parasitology Research*, 1-8.
- CESUR, S.;BAHAR, K. y EREKUL, S. 2002. Death from cumulative sodium stibogluconate toxicity on Kala-Azar. *Clinical Microbiology and Infection*, 8, 606.
- COIMBRA, E.;ANTINARELLI, L.;SILVA, N.;SOUZA, I.;MEINEL, R.;ROCHA, M.;SOARES, R. y DA SILVA, A. 2016. Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. *Chemico-Biological Interactions*, 25, 50-7.
- COLMENARES, M.;CORBI, A.;SALVATORE, L.;TRUCO, J. y RIVAS, L. 2004. The Dendritic Cell Receptor DC-SIGN Discriminates among Species and Life Cycle Forms of Leishmania. . *The Journal of Immunology*.
- DAS, D. 2017. Synthesis, SAR and biological studies of sugar amino acid-based almiramide analogues: N-methylation leads the way. *Organic & Biomolecular Chemistry*.
- DAVID, C. y CROFT, N. 2009. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, 22, 491–502.
- DAVIES, C.;KAYE, P.;CROFT, S. y SUNDAR, S. 2003. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *British Medical Journal*, 326, 377-82.
- DAWIT, G.;GIRMA, Z. y SIMENEW, K. 2013. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *Journal of Bacteriology and Parasitology*, 4, 1-7.
- DIEHL, K.;HULL, R.;MORTON, D.;PFISTER, R.;RABEMAMPIANINA, Y.;SMITH, D.;VIDAL, J. y VORSTENBOSCH, C. 2001. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. *The Journal of Applied Toxicology*, 21, 15–23.
- DORLO, Y.;BALASEGARAM, M.;BEIJNEN, J. y DE VRIES, P. 2012. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 576–2597.
- DUTRA, L.;DE ALMEIDA, L.;PASSALACQUA, T.;REIS, J.;TORRES, F.;MARTINEZ, I.;PECCININI, R.;CHIN, C.;CHEGAEV, K.;GUGLIELMO, S.;FRUTTERO, R.;GRAMINHA, M. y DOS SANTOS, J. 2014. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, 58, 4837-47.
- EKIZ, O.;NUR, E.;BULBUL, B.;CULHA, G.;OZGUR, T. y CIGDEM, A. 2015. Leishmaniasis recidiva cutis of the lips mimicking granulomatous chailitis. *Indian Journal of Dermatology*, 60, 216.
- EL GHOZLANI, M.;BOUISSANE, L.;BERKANI, M.;MOJAHIDI, S.;ALLAM, A.;MENENDEZ, C.;COJEAN, S.;LOISEAU, P.;BALTASB, M. y RAKIB, E. 2018. Synthesis and biological evaluation against *Leishmania donovani* of novel hybrid molecules containing indazole-based 2-pyrone scaffolds. *Medicinal Chemistry Communication*, 10, 120-7.
- FACCINI-MARTÍNEZ, Ä. y FALQUETO, A. 2016. Lsishmaniasis Recidiva Cutis. *The American Journal Of Tropical Medicine and Hygiene*, 95, 1221-22.
- FIDALGO, L. y GILLE, L. 2011. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharmaceutical Research*, 28, 2758-70.
- FIGUEIREDO, E.;MADEIRA, M.;NASCIMENTO, L.;ABRANTES, T. y MOUTA-CONFORT, E. 2010. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 52, 193-6.

Bibliografía

- FONSECA-BERZAL, C.; IBAÑEZ-ESCRIBANO, A.; REVIRIEGO, F.; CUMELLA, J.; MORALES, P.; JAGEROVIC, N.; NOGAL-RUIZA, J.; ESCARIO, J.; BERNARDINO DA SILVA, P.; SOEIRO, M.; GÓMEZ-BARRIO, A. y ARÁN, V. 2016. Antichagasic and trichomonacidal activity of 1-substituted 2-benzyl-5-nitroindazolin-3-ones and 3-alkoxy-2-benzyl-5-nitro-2 Hindazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 115, 295-310.
- FONSECA-BERZAL, C.; IBAÑEZ-ESCRIBANO, A.; VELA, N.; CUMELLA, J.; NOGAL-RUIZA, J.; ESCARIO, J.; BERNARDINO DA SILVA, P.; MEUSER, M.; GÓMEZ-BARRIO, A.; SOEIRO, M.; SIFONTES-RODRÍGUEZ-S.; MENESES-MARCEL, A. y ARÁN, V. 2018. Antichagasic, Leishmanicidal, and Trichomonacidal Activity of 2-Benzyl-5-nitroindazole-Derived Amines. *CHEMMEDCHEM*, 13, 1246-59.
- FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. y RIBEIRO, R. 2009. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules*, 14, 2317-36.
- GERPE, A.; AGUIRRE, G.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; GONZALEZ, M. y OLEA-AZAR, C. 2006. Indazole N-oxide derivatives as antiprotozoal agents: Synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 3467-80.
- GHORBANI, M. y FARHOUDI, R. 2018. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? . *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 25-40.
- GÓMEZ V. 2013. *Nuevos piridofanos simétricos con actividad antiproliferativa y leishmanicida*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- GRAY, K.; PALACIOS, D.; DAILEY, I.; ENDO, M.; UNO, B. y WILCOCK, B. 2012. Amphotericin Primarily Kills Yeast by Simply Binding Ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 2234-9.
- GRIMALDI, G. y TESH, R. 1993. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clinical Microbiology Reviews*, 6, 230-50.
- GROGL, M.; HICKMAN, M.; ELLIS, W.; HUDSON, T.; LAZO, J.; SHARLOW, E.; JOHNSON, J.; BERMAN, J. y SCIOTTI, R. 2013. Drug discovery algorithm for cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88, 216-21.
- HARRINGTON, E. 1965. The desirability function. *Industrial Quality Control*, 21, 230-50.
- HERMAN, J.; GALLALEE, J. y BEST, J. 1987. Sodium stibogluconate (pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid β -oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochemical Pharmacology*, 36, 197-201.
- IBAÑEZ-ESCRIBANO, A. 2016. *Trichomonas vaginalis: Corroboración experimental de modelos virtuales de cribado farmacológico y caracterización biomolecular de aislados*. Doctorado, Universidad Complutense de Madrid.
- JAYANTHI, M. y RAJAKUMAR, P. 2017. Synthesis, cell viability, and flow cytometric fluorescence pulse width analysis of dendrimers with indazoles surface unit. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 54, 3042-50.
- JEDDI, F.; PIARROUX, R. y MARY, C. 2011. Antimony Resistance in *Leishmania*, Focusing on Experimental Research. *Journal of Tropical Medicine*, 1-15.
- KAUFER, A.; ELLIS, J.; STARK, D. y BARRATT, J. 2017. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*, 10, 1-17.
- KAUR, R.; BHOJA, P.; JAIN, U.; PRAVEEN, P. y SATYAVATHI, K. 2011. Synthesis and anti-inflammatory activities of 7-Benzylidene-2, 3-diphenyl-4, 5, 6, 7-tetrahydro-2H-indazole derivatives. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2, 118-29.
- KAYE, P. y SCOTT, P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 604-15.

Bibliografía

- KUMAR, R.;BHUSHAN, S.;NG, S.;SUNDAR, S. y ENGWERDA, C. 2017. Immune Checkpoint Targets for Host-Directed Therapy to Prevent and Treat Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 8, 1-14.
- LAINSON, R. y SHAW, J. 1987. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, London: Academic Press.
- LANIADO-LABORÍN, R. y CABRALES-VARGAS, M. 2009. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26, 223–7.
- LAVRARD, H. y POPOWYCZ, F. 2018. Regioselective late-stage C-3 functionalization of pyrazolo-[3,4-b]pyridines. *Synthesis*, 50, 998–1006.
- LIPOLDOVÁ, M. y DEMANT, P. 2006. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Genetics*, 7, 294-305.
- LORÍA-CERVERA, E. y NARVAEZ, F. 2014. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Revista Instituto Medicina Tropical*, 56, 1-11.
- LOUKINE, E.;WAWER, M.;WASSERMANN, A. y BAJORATH, J. 2010. SARANEA: a freely available program to mine structure-activity and structure-selectivity relationship information in compound data sets. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50, 68-78.
- LUMSDEN, W. 1974. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 68, 74–5.
- MARÍN, C.;RAMÍREZ-MACÍAS, I.;ROSALES, M.;MURO, B.;REVIRIEGO, F.;NAVARRO, P.;ARÁN, V. y SÁNCHEZ-MORENO, M. 2015. *In vitro* leishmanicidal activity of 1,3-disubstituted 5-nitroindazoles. *Acta Tropica*, 04, 1-9.
- MARINHO, F.;GONCALVES, K.;OLIVEIRA, S.;COUTO, A.;BELLIO, M.;MASINI, C.;SOUZA DOS SANTOS, A. y BRANQUINHA, M. 2011. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106, 507-9.
- MARTÍN-MONTES, Á.;AGUILERA-VENEGAS, B.;MORALES-MARTÍN, R.;MARTÍN-ESCOLANO, R.;ZAMORA-LEDESMA, S.;MARÍN, C.;ARÁN, V. y SÁNCHEZ-MORENO, M. 2019. *In vitro* assessment of 3-alkoxy-5-nitroindazole-derived ethylamines and related compounds as potential antileishmanial drugs. *Bioorganic Chemistry*, 11.
- MEARS, E.;MODABBER, F.;DON, R. y G., J. 2015. A Review: The Current *In Vivo* Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9, 1-23.
- MONZOTE, L. 1999. *Evaluación de la actividad de dos nuevos compuestos frente a la leishmaniosis cutánea experimental*. Licenciada Tesis presentada para optar por el grado de Licenciada en Ciencias Farmacéuticas, Universidad de La Habana.
- MONZOTE, L. 2011. Antileishmanial patents antileishmanial current drugs and relevant patents. *Recent Patents Anti-Infective Drug Discovery*, 6, 1-26.
- MOURI, R.;KONOKI, K.;MATSUMORI, N.;OISHI, T. y MURATA, M. 2008. Complex formation of amphotericin B in sterolcontaining membranes as evidenced by surface plasmon resonance. *Biochemistry*, 47, 7807-15.
- O’KEFFE, A.;HYNDMAN, L.;MCGINTY, S.;RIEZK, A.;MURDAN, S. y CROF, S. 2019. Development of an *in vitro* media perfusion model of *Leishmania major* macrophage infection. *PLoS ONE*, 14.
- OECD; 2001. Organisation For Economic Co-Operation And Development 2001. OECD Guideline for testing of Chemicals. . 423, 1-14.
- OKWOR, I. y UZONNA, J. 2016. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *American Journal Tropical Medical Hygienic*, 94, 489–93.
- OLIVEIRA, S.;SCHUBACH, A.;MARTINS, M.;PASSOS, S.;OLIVEIRA, R.;MARZOCHI, M. y ANDRADE, C. 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica*, 118, 87-96.

Bibliografía

- OLIVEIRA, V.;DOS SANTOS FAIOE, V.;GONCALVES, G.;LIMA, M.;BOECHAT, F.;CUNHA, A.;DE ANDRADE-NETO, V.;DA SILVA, F.;TORRES-SANTOS, E. y DE SOUZA, M. 2018. Design, Synthesis and Antileishmanial Activity of Naphthotriazolyl-4-Oxoquinolines. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18, 1454-64.
- OURIVES-NEVES, L.;CHRUSCIAK-TALHARI, A.;GADELHA, E.;DA SILVA JÚNIOR, R.;GUERRA, J.;FERREIRA, L. y TALHARI, S. 2011. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86, 1092-101.
- PAHO/WHO 2018. Leishmaniasis. Epidemiological Report of the Americas. Washington: PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION - PAHO/WHO.
- PAILA, Y.;SAHA, B. y CHATTOPADHYAY, A. 2010. Amphotericin B inhibits entry of *Leishmania donovani* into primary macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399, 429–33.
- PALADI, C.;DA SILVA, D.;MOTTA, P.;GARCIA, D.;TEIXEIRA, D.;LONGO-MAUGÉR, I.;KATZ, S. y BARBIÉRI, C. 2017. Treatment of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-Infected Mice with a Combination of a Palladacycle Complex and Heat-Killed *Propionibacterium acnes* Triggers Protective Cellular Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, 8, 1-11.
- PALIC, S.;BHALROSING, P.;BEIJNEN, J. y DORLO, T. 2019. Systematic Review of Host-Mediated Activity of Miltefosine in Leishmaniasis through Immunomodulation. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 63.
- PARIS, C.;LOISEAU, P.;BORIES, C. y BRÉARD, J. 2004. Miltefosine Induces Apoptosis- Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 852-9.
- PINK, R.;HUDSON, A.;MOURIÈS, M. y BENDIG, M. 2005. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 727-40.
- PLOCK, A.;SOKOLOWSKA-KÖHLER, W. y PRESBER, W. 2001. Application of flow cytometry and microscopical methods to characterise the effect of herbal drugs on *Leishmania spp.* *Experimental Parasitology*, 97, 141-53.
- PRATT, D. y DAVID, J. 1981. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature*, 291, 581–3.
- QUINNELL, R. y COURTENAY, O. 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral Leishmaniasis. *Parasitology*, 136, 1915-34.
- READY, P. 2014. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, 6, 147–54.
- REIMÃO, J. y ULIANA, S. 2018. Tamoxifen alters cell membrane properties in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitology Open*, 4, 1-6.
- REITHINGER, R.;DUJARDIN, J.;LOUZIR, H.;PIRMEZ, C.;ALEXANDER, B. y BROOKER, S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7, 124-6.
- RIBEIRO, L.;DE OLIVEIRA, I., ;;GLANZMANN, N.;DAS CHAGAS, A.;NASCIMENTO, G.;GOMES, E.;DAVID DA SILVA, A. y SOARES, E. 2016. Aminoquinoline compounds: Effect of 7-chloro-4-quinolinylhydrazone derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, 171, 10-6.
- ROCHA, V.;QUINTINO, C.;FERREIRA, E.;MARCOURT, L.;VILEGAS, W.;GRIMALDI, G.;FURRER, P.;ALLÉMANN, E.;WOLFENDER, J. y SOARES, M. 2019. Antileishmanial Activity of Dimeric Flavonoids Isolated from *Arrabidaea brachypoda*. *Molecules*, 24, 1-13.
- RODRÍGUES, J.;GERPE, A.;AGUIRRE, G.;KEMMERLING, U.;PIRO, O.;ARÁN, V.;MAYA, J.;OLEA-AZAR, C.;GONZÁLEZ, M. y CERECETTO, H. 2009. Study of 5-nitroindazoles' anti-*Trypanosoma cruzi* mode of action: Electrochemical behaviour and ESR spectroscopic studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 1545-53.

Bibliografía

- ROLÓN, M.;VEGA, M.;ESCARIO, J. y GÓMEZ, A. 2006. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology* 99, 103-7.
- ROSSI, M. y FASEL, N. 2017. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *International Immunology*, 30, 103–11.
- SACKS, D. y KAMHAWI, S. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology*, 55, 453-83.
- SAVOIA, D. 2015. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9, 588-96.
- SCARIOT, D.;BRITTA, E.;MOREIRA, A.;FALZIROLLI, H.;SILVA, C.;UEDA-NAKAMURA, T.;DIAS-FILHO, B. y NAKAMURA, C. 2017. Induction of Early Autophagic Process on *Leishmania amazonensis* by Synergistic Effect of Miltefosine and Innovative Semi-synthetic Thiosemicarbazone. *Frontiers in Microbiology*, 21, 255.
- SCORZA, B.;CARVALHO, E. y WILSON, M. 2017. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1-26.
- SHAKIL, N.;SINGH, M.;SATHIYENDIRAN, M.;KUMAR, J. y PADARIA, J. 2013. Microwave synthesis, characterization and bio-efficacy evaluation of novel chalcone based 6-carbethoxy-2-cyclohexen-1-one and 2H-indazol- 3-ol derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 120- 31.
- SHARMA, U. y SINGH, S. 2008. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases*, 45, 255–72.
- SHINDE, A.;VIDYACHARAN, S. y SHARADA, D. 2016. BF₃•OEt₂ mediated metal-free one-pot sequential multiple annulation cascade (SMAC) synthesis of complex and diverse tetrahydroisoquinoline fused hybrid molecules. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 14, 3207–11.
- SIFONTES, S. 2017. *Descubrimiento racional de compuestos químicos para el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas* Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- SILVEIRA, C.;AGUILAR, M.;NOIREAU, F.;MONROY, C.;JARAMILLO, N. y SEGURA, E. 2007. Update of American Trypanosomiasis and Leishmaniasis Control and Research: Final Report. Brasil: Pan American Health Organization / World Health Organization (PAHO/WHO), Sociedade de Pediatria do Estado de Rio de Janeiro (SOPERJ)
- SINDERMANN, H. y ENGEL, J. 2006. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, 4-8.
- SOTO, J. y SOTO, P. 2006. Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. *Biomédica*, 26, 207-17.
- SOYER, T. 2019. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of a chloroquinolin derivative against *Leishmania* species capable of causing tegumentary and visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*
- STAUCH, A.;DUERR, H.;DUJARDIN, J.;VANAERSCHOT, M.;SUNDAR, S. y EICHNER, M. 2012. Treatment of visceral leishmaniasis: model-based analyses on the spread of antimony-resistant *L. donovani* in Bihar, India. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
- STEINBECK, C.;HAN, Y.;KUHN, S.;HORLACHER, O.;LUTTMANN, E. y WILLIGHAGEN, E. 2003. The chemistry development kit (CDK): an open source Java library for Chemo- and Bioinformatics. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 43, 493-500.

Bibliografía

- STEINBECK, C.;HOPPE, C.;KUHN, S.;FLORIS, M.;GUHA, R. y WILLIGHAGEN, E. 2006. Recent developments of the chemistry development kit (CDK) - an open-source java library for chemo and chemoand bioinformatics. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 2111-20.
- STEPHENS, N.;RAWLINGS, B. y CAFFREY, P. 2012. Streptomyces nodosus Host Strains Optimized for Polyene Glycosylation Engineering. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76, 384–7.
- STEVERDING, D. 2017. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 10, 1-10.
- SUNDAR, S. y RAI, M. 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical Diagnostic Laboratory and Immunology*, 9, 951-8.
- SUNYOTO, T.;POTET, J. y BOELAERT, M. 2018. Why miltefosine - a life - saving drug for leishmaniasis- is unavailable to people who need it the most *British Medical Journal Global Health*, 3, 1-10.
- TEIXEIRA DE MACEDO, S.;VISBAL, G.;LIMA, J.;URBINA, J.;DE SOUZA, W. y COLA, J. 2018. *In vitro* antileishmanial activity of ravuconazole, a triazole antifungal drug, as a potential treatment for leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2360–73.
- TELLERIA, E.;MARTINS-DA-SILVA, A.;TEMPONE, A. y TRAUB-CSEKÖ, Y. 2018. *Leishmania*, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*, 1-18.
- TORRES-GUERRERO, E.;QUINTANILLA-CEDILLO, M.;RUIZ-ESMENJAUD, J. y ARENAS, R. 2017. Leishmaniasis: a review. *Research*, 6, 1-15.
- TOVAR, C. y YASNOT, M. 2017. Visceral Leishmaniasis in Latin America and therapy perspectives. *Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia Cordoba*, 22, 6075-88.
- VEGA, M.;ROLÓN, M.;MONTERO-TORRES, A.;FONSECA-BERZAL, C.;ESCARIO, J.;GÓMEZ-BARRIO, A.;GÁLVEZ, J.;MARRERO-PONCE, Y. y ARÁN, V. 2012. Synthesis, biological evaluation and chemometric analysis of indazole derivatives. 1,2-Disubstituted 5-nitroindazolinones, new prototypes of antichagasic drug. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 214-27.
- VIDYACHARAN, S.;MURUGAN, A. y SHARADA, D. 2016. C(sp²)-H Functionalization of 2H-indazoles at C3-position via palladium(II)-catalyzed isocyanide insertion strategy leading to diverse heterocycles. *The Journal of Organic Chemistry*, 81, 2837–48.
- WHYTE, D. y ZUFFEREY, R. 2017. Cutaneous Leishmaniasis: Update on Vaccine Development. *Human Parasitic Diseases*, 9, 1-7.
- YAGHOobi-ERSHADI, M. 2016. Control of Phlebotomine Sand Flies in Iran: A Review Article. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 10, 429–44.
- ZHU, X.;VAN, K. y WERBOVETZ, K. 2015. SAR refinement of antileishmanial N(2), N(4)-disubstituted quinazoline -2,4-diamines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.